ASPEKTE DER ABHÄNGIGKEIT DER KONJUGATION BEI ESCHERICHIA COLI K-12 VON ZWEI NEUEN WIRTSFAKTOREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lothar Beutin
aus Berlin

Berlin 1978

ASPEKTE DER ABHÄNGIGKEIT DER KONJUGATION BEI *ESCHERICHIA COLI* K-12 VON ZWEI NEUEN WIRTSFAKTOREN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Biologie (23)

der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lothar Beutin

aus Berlin

Berlin 1978

1. Gutachter: Professor Dr. T.A. Trautner

2. Gutachter: Professor Dr. E.R. Lochmann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1978

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin 33 in der Zeit von Oktober 1975 bis Oktober 1978 angefertigt.

Herrn Dr. M. Achtman und Herrn Prof. Dr. T.A. Trautner danke ich für großzügige Unterstützung und die sorgfältige wissenschaftliche Betreuung. Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. R. Helmuth, Dr. N. Kennedy, Dr. P. Manning, Dr. R. Thompson und allen Mitarbeitern des Labors für anregende Diskussionen.

Frau Dr. G. Morelli und Herrn Dr. R. Lurz bin ich für die Hilfestellung bei der Elektronenmikroskopie zu Dank verpflichtet.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Trautner und des Hauses für das gute Arbeitsklima bedanken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544718_0007

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Aspekte transferierbarer Plasmide	1
1.2	Genetische Eigenschaften des F-Faktors	2
1.3	Plasmidabhängige Regulation der Konjugationsfunktion	3
1.4	Abhängigkeiten der Plasmidfunktionen von Wirtsgenprodukten	5
1.4.1	Notwendige Wirtsfunktionen zur Rezipientenfähigkeit	6
1.4.2	Notwendige Wirtsfunktionen zur Donatorenfähigkeit	7
2.	Material und Methoden	10
2.1	Medien	10
2.1.1	Flüssige Medien	10
2.1.2	Feste Medien	11
2.1.3	Chemikalien	12
2.2	Bakterien	13
2.2.1	Stammliste	15
2.3	Genetische Methoden	17
2.3.1	Quantitativer Transferierungstest	17
2.3.2	Qualitativer Transferierungstest	17
2.3.3	F-Pilus spezifischer Phagensensitivitätstest	17
2.3.4	Quantitativer Surface Exclusion Test und Ermittlung des Surface Exclusion Index (SEI)	18
2.4	Bakteriophagen	18
2.4.1	Bakteriophagenlysate	18

2.4.2	"Spot-Tests"	19
2.4.3	Phagentitrationen	19
2.5	Genetische Kartierungsmethoden	19
2.5.1	Hfr Kreuzungen	19
2.5.2	P1 Transduktion	20
2.5.3	Komplementationstest	20
2.6	Allgemeine genetische Methoden	22
2.6.1	Isolierung von Nal^r Stämmen	22
2.6.2	Isolierung von Thy^- Stämmen	22
2.6.3	Isolierung von recA$^-$ Derivaten der sfrA und sfrB Komplementationsstämme	22
2.6.4	Acridine Orange "Curing"	23
2.6.5	Transformation	23
2.6.6	Motilitätstest	24
2.6.7	Antibiotika Sensitivitätstest	24
2.7	Biochemische Methoden	24
2.7.1	Membranisolation	24
2.7.2	SDS-Gelelektrophorese der Membranpräparationen	25
2.8	Immunbiologische Methoden	26
2.8.1	F-Pilus Präzipitationstest	26
2.9	Elektronenoptische Methoden	27
2.9.1	Präparationen für die Elektronenmikroskopie	27
2.9.2	Elektronenmikroskopie	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Isolierung und Charakterisierung der sfrA und sfrB Mutanten	28
3.1.1	Ziel der Mutantenisolierung	28
3.1.2	Eigenschaften der sfr$^-$ Mutanten	28

3.2	Genetische Kartierung der sfrA und sfrB Mutanten	30
3.2.1	Bestimmung der Genfolgen zwischen den sfrA und sfrB Mutanten in bzug zu jeweils zwei bekannten Genmarkern	32
3.2.2	Kartierung der sfrA Mutanten mit P1 Drei-Faktor-Kreuzungen	32
3.2.3	Kartierung der sfrB Mutanten mit P1 Drei-Faktor-Kreuzungen	34
3.3	Komplementations- und Rekombinationsanalyse der sfrA und sfrB Mutanten	34
3.3.1	Komplementationsanalyse der sfrA Mutanten	36
3.3.2	Rekombination zwischen den sechs sfrA Mutanten	38
3.3.3	Komplementations- und Rekombinationsanalyse der sfrB Mutanten	39
3.3.4	Rekombination zwischen den sechs sfrB Mutanten	42
3.4	Untersuchungen zum Wirkungsbereich der sfrA und sfrB Mutanten	43
3.4.1	Einfluß der sfrA und sfrB Mutationen auf andere transferierbare Plasmide	43
3.5	Membranspezifische Effekte der sfrB Mutanten	46
3.5.1	Auswirkungen der sfrA und sfrB Mutationen auf das Bakteriophagensensitivitätsmuster von E. Coli K-12	46
3.5.2	Auswirkungen der sfrB Mutationen auf die Transformierbarkeit und Antibiotikasensitivität der Wirtsstämme	49
3.5.3	SDS-Gelelektrophoretische Untersuchung der Membranproteine der sfrA und sfrB Mutanten	50
3.6	Untersuchungen zur F-Pilus Bildung der sfrA und sfrB Mutanten	54
3.7	Pleiotrope Effekte der sfrB Mutanten auf Flagellanfunktionen	55

3.8 Untersuchungen über die Spezifität des sfrA und sfrB Cistrons zur Transkription und Expression der Gene des Flac tra-Operons 57

3.8.1 Untersuchungen an pRS31 tragenden sfrA und sfrB Mutanten 57

4. Diskussion 60

4.1 Gemeinsame Aspekte der sfrA und sfrB Mutanten 60

4.2 Aspekte der sfrA Mutanten 61

4.3 Aspekte der sfrB Mutanten 64

4.4 Ausblick 68

5. Zusammenfassung 72

6. Literatur 73

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Aspekte transferierbarer Plasmide

Als Plasmide bezeichnet man zur Replikation befähigte genetische Elemente (DNA), die extrachromosomal bei Bakterien vorkommen können (75). Eine besondere Gruppe der Plasmide stellen die zur Konjugation befähigten Sex-Faktoren dar, die zur interzellulären Übertragung genetischen Materials in der Lage sind (75).

Hierbei unterscheidet man zwischen drei Hauptklassen: R(esistenz)-Faktoren, die die Fähigkeit zur Übertragung von Antibiotikaresistenzen determinieren (75, 92), Col(izin)-Faktoren, die die Produktion und Resistenz gegen ein für E. Coli spezifisches Bakteriocin codieren (75, 38) und der F(ertilitäts)-Faktor, der 1946 von Lederberg (58, 59) entdeckt und beschrieben wurde.

Untersuchungen am Konjugationsprozeß ergaben, daß hierbei F^+ (F-Faktor-tragende) und F^- (ohne F-Faktor) Zellen beteiligt sind, und daß der F-Faktor extrachromosomal in der Zelle vorliegen kann (22).

Anhand von Rekombinationsuntersuchungen stellte sich heraus, daß ein im Chromosom integrierter F-Faktor die Übertragung chromosomaler DNA seines Wirtes auf Empfängerzellen vermittelt (21, 100). Solche Stämme wurden als Hfrs (High Frequency of Recombination) bezeichnet. Weiterhin konnte man aus Hfr Kreuzungen mit rekombinationsdefekten Rezipienten sogenannte F' Faktoren isolieren, welche als autonome Plasmide neben der F-DNA auch chromosomale DNA des Wirtes tragen (63).

Hfr Kreuzungen und genetische Untersuchungen mit F' Faktoren und dem transduzierenden Bakteriophagen P1 (60) führten zur Aufstellung der Genkarte des E. Coli K-12 Chromosoms (Seite 31) mit heute über 650 bekannten Genorten (14).

1.2 Genetische Eigenschaften des F-Faktors (siehe auch F-Karte)

Bald nach der Entdeckung der transferierbaren Plasmide begann man deren genetische Eigenschaften zu untersuchen. Hierbei stellt der F-Faktor das bisher am weitesten charakterisierte Plasmid dar, dem verschiedene genetische Funktionen zugeordnet wurden, die hier anfolgend beschrieben werden:

Man erkannte, daß unter der Vielfalt der Sex-Faktoren bestimmte Plasmide nicht gemeinsam in einer Zelle mitrepliziert werden können. Dies führte zur Erkenntnis der Plasmid-spezifischen Incompatibilität (74). Darauf aufbauend wurden die bekannten F, R und Col Faktoren in Incompatibilitätsgruppen (75) gegliedert. Plasmide einer Gruppe können nicht gemeinsam in einer Zelle fortbestehen. Die Gene dieser Funktion inc, wurden auf dem F-Faktor kartiert (95).

Bei der Untersuchung der Replikation des F-Faktors wurden Plasmid-spezifische Mutanten (rep) die replikationsdefekt sind, isoliert (28, 52) und auf dem F-Faktor genetisch lokalisiert (30, 65, 88, 90).

Ferner erkannte man, daß eine weitere F spezifische Funktion existiert, die der F^+ Zelle Resistenz gegen die Bakteriophagen T7 und ØII verleiht (99). Die pif Gene, die diese Funktion bestimmen, wurden neben den rep und inc Genen dem F-Faktor zugeordnet (89).

Einen Hauptaspekt der Untersuchungen am F-Faktor stellt jedoch das F eigene Konjugationssystem dar. Da in dieser Arbeit chromosomale Mutanten von E. Coli K-12 beschrieben werden, die das F-Konjugationssystem beeinflussen, sollen zum besseren Verständnis die Transferierungsfunktionen des F-Faktors eingehend abgehandelt werden:

So erkannte man, daß das Vorhandensein des filamentartigen F-Pilus, der auch als Rezeptor für eine Gruppe von Bakteriophagen dient (20, 27), essentiell für den DNA-Transfer ist (9, 18). Hierbei wurden neun Transferierungsgene ermittelt, traA-traG, die zur F-Pilus Synthese notwendig sind (10, 94, 97).

Der Prozeß des DNA-Transfers selbst ist darüber hinaus noch von der Funktion der Gene traM, traD, traI und eines Teils von traG abhängig (8, 10).

Eine weitere Eigenschaft des F-Konjugationssystems ist die schlechte Rezipientenfähigkeit von F^+ Zellen (Surface-Exclusion). Es wurden F Mutanten isoliert, die diese Eigenschaft verloren hatten Sfx^- (9). Inzwischen ist bekannt, daß zwei Gene, traS und traT, den DNA-Transfer vermindern und den Aufbau stabiler Transferierungsaggregate (2) verhindern (4). Jedoch sind traS und traT Mutanten in ihrer Donatorfähigkeit nicht beeinflußt (7, M. Achtman, pers. Mitt.).

Untersuchungen von Helmuth und Achtman (15) konnten für die Gene von traA bis traI eine Operonstruktur ermitteln. Hierbei dient ein Gen außerhalb des tra-Operons, traJ (50, 97), als positives Kontrollgen zur Transkription des Operons (1, 96). Mutanten in traJ haben einen pleiotropen Effekt auf das tra-Operon und sind daher Tra^- und Sfx^-.

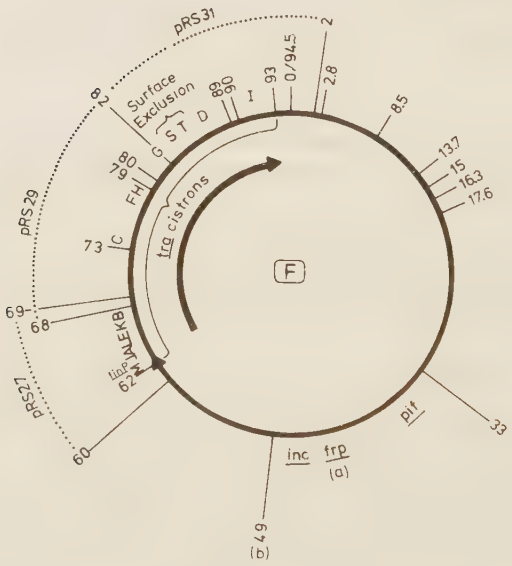
Für den biochemischen Nachweis der Proteine des tra-Operons wurden drei clonierte Restriktionsfragmente (89) - prS27, pRS29 und pRS31 - die zusammen das tra-Operon überdecken (8), verwendet. Kennedy et al. (55) konnten mit Hilfe dieser neugeschaffenen Plasmide in Minizell und in vitro Systemen zwölf tra Proteine identifizieren und das Vorhandensein der meisten dieser Proteine in der bakteriellen Membran nachweisen.

1.3 Plasmidabhängige Regulation der Konjugationsfunktion

Die Transferierungsgene vieler Sex-Faktoren sind natürlicherweise reprimiert; so daß deren Transferierungsrate, im Vergleich mit F, wesentlich niedriger liegt (71). Von einigen Sex-Faktoren konnten dereprimierte Derivate isoliert werden (71), die mit hoher Frequenz transferieren.

Daneben bewirkt auch das Vorhandensein bestimmter Plasmide,

Karte des F-Faktors nach Achtman et al.(5)



(a) F Replicationsgene

(b) Einteilung der Karte in Kilobasen

die fin$^+$ (fertility inhibition) genannt werden (71) und gemeinsam mit dem F-Faktor in einer Zelle vorkommen können, eine Reduktion des F Transfers. Willets und Finnegan (98) fanden bei F$^+$ (Flac) Stämmen, die zusätzlich einen reprimierten R-Faktor trugen (R100), eine starke Reduktion des F DNA-Transfers.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß zwei Proteine (finP und finO Genprodukte) einen Transfer Repressor bilden, der die Synthese des traJ Genproduktes verhindert und somit die Expression des tra-Operons blockiert.

Zur Eigenrepression des Transfers fehlt dem F-Faktor ein intaktes finO Produkt, welches von ihm nicht gebildet wird. Das finP Produkt dagegen ist Plasmid-spezifisch und wird auch vom F-Faktor synthetisiert (34, 35).

Neben dem FinOP Kontrollsystem existieren von anderen Sex-Faktoren codierte Kontrollsysteme, die unterschiedlich auf die Expression der F-Transferierungsfunktionen Einfluß nehmen (37).

1.4 Abhängigkeiten der Plasmidfunktionen von Wirtsgenprodukten

Neben Plasmid bestimmten Faktoren sind bisher auch einige Wirtsfunktionen bekannt, die auf verschiedene Funktionen von Sex-Faktoren Einfluß nehmen.

Bisher erfolgte Untersuchungen hierzu bezogen sich auf das Rezipientenverhalten von Bakterien (1.4.1), obwohl auch chromosomal Faktoren des Wirts bekannt sind, die auf das Donatorverhalten Einfluß nehmen (1.4.2).

Das Ziel dieser Arbeit ist eine Untersuchung über die Abhängigkeit des Konjugationsprozesses in E. Coli K-12 von Genprodukten des Wirtes. Hierbei werden neue, bisher unbekannte Faktoren, die die Donatorenfunktionen beeinflussen, untersucht.

Neben der Konjugationsfunktion zeigt sich auch die Repli-

kation gewisser Plasmide vom Wirt abhängig. Hierbei spielen ribosomale Faktoren (101, 102) und bisher nicht genau identifizierte Funktionen eine Rolle.

1.4.1 Notwendige Wirtsfunktionen zur Rezipientenfähigkeit

Aus allen Untersuchungen hierzu geht hervor, daß die Beschaffenheit der bakteriellen Membran einen entscheidenden Einfluß auf das Rezipientenverhalten von Zellen hat. Defekte Rezipienten werden in der Literatur allgemein als Con^- (Conjugation deficient) bezeichnet.

Solche Mutanten sind erstmals von Monner et al. (72) als Ampicillin resistente Stämme mit veränderter Lipopolysaccharidschicht (LPS) beschrieben worden.

Andere von Reiner (80) und Havekes et al. (41, 42, 43) isolierte Con^- Mutanten zeigten ebenfalls LPS Defekte und teilweise Proteinveränderungen in der äußeren Membran (42, 43).

Skurray et al. (87) und Manning et al. (69) zeigten in ihren Untersuchungen, daß ein Hauptprotein der bakteriellen äußeren Membran II* essentiell für den Rezipienten im Konjugationsprozeß ist. In ompA Mutanten fehlt dieses Protein und solche Stämme zeigen bis 1000fach erniedrigte Rezipientenfähigkeit in der Konjugation. Nach Achtman et al. (6) ist dieses Protein offenbar zum Aufbau stabiler Transferierungsaggregate erforderlich. Die Donatorenfähigkeit dieser Mutanten ist jedoch normal (P. Manning, pers. Mitteilung).

Offenbar führen auch andere gewisse Membranveränderungen, die pleiotrope Effekte auf Antibiotikasensitivität (33, 43, 72, 80), Bakteriophagensensitivität (42, 43, 80) und Flagellenfunktionen (42, 43, 80) zeigen können, zum Auftreten von Con^- Phänotypen. Ungeachtet der generellen Effekte solcher Membranveränderungen scheint jedoch hinsichtlich der Con^- Eigenschaft dieser Mutanten eine star-

ke Spezifität zu bestehen.

So konnten Manning und Reeves (69) unter verschiedenen Mutanten mit pleiotrop verändertem Bakteriophagensensitivitätsmuster zwei voneinander unterschiedliche Klassen von Con⁻ Mutanten feststellen. Dabei zeigte sich die eine Klasse nur defekt im Flac Transfer, wohingegen die andere den R100 Transfer betraf. Untersuchungen von Havekes et al. (43) konnten ebenfalls starke Spezifität unter Con⁻ Stämmen hinsichtlich des betroffenen Plasmids feststellen.

Die Isolierung der verschiedenen Con⁻ Mutanten geschah nicht zuletzt in der Absicht, den Rezeptor des Rezipienten für den F-Pilus zu finden. Untersuchungen von Achtman et al. (6) ergaben jedoch, daß bei keiner Klasse der bisher isolierten Con⁻ Mutanten dieser Rezeptor betroffen ist. Es wird angenommen, daß diese Mutanten im Aufbau stabiler Transferierungsaggregate (2) betroffen sind.

1.4.2 Notwendige Wirtsfunktionen zur Donatorenfähigkeit

Während bei den bisher untersuchten Con⁻ Mutanten Membrandefekte allein als verantwortlich anzusehen sind, zeigen chromosomale Faktoren, die die Donatorenfähigkeit von Zellen beeinflussen, unterschiedliche Aspekte der Wirkung.

Hierbei spielen pleiotrope Membranmutanten (P. Silverman, pers. Mitteilung und diese Arbeit), aber auch Transkriptions- und Tranlationsfaktoren und darüber hinaus noch unbestimmte Einflüsse, eine Rolle. Alle bisher beschriebenen Wirtsmutanten, die die Donatorfähigkeit beeinflussen, scheinen genetisch mit den in dieser Arbeit behandelten Mutanten nicht identisch zu sein.

Unter den Transkriptionsfaktoren fanden Sabourin und Beckwith (83) einen Einfluß von crp Mutanten auf das Konjugationsverhalten von F⁺ Zellen, so daß die Trans-

ferierungsrate dieser Stämme 10fach erniedrigt war. Ein Einfluß auf die Rezipientenfähigkeit wurde dagegen nicht festgestellt.

Riva et al. (81) zeigten, daß niedrige Dosen von Rifampicin die Transkription des F tra-Operons und die der pif Gene speziell beeinflußt. Dies zeigte sich durch eine Verminderung des DNA Transfers, der Resistenz gegenüber F-Pilus spezifischer Bakteriophagen und der Aufhebung der F^+ spezifischen T7 und ØII Phagenresistenz. Bei Entzug von Rifampicin zeigte sich dieser Effekt als reversibel.

Im folgenden gelang es Rif^r Stämme zu isolieren (82), die die gleichen Eigenschaften zeigten wie Wildtypstämme nach Rifampicinzugabe. Diese Mutanten wurden genetisch untersucht und zeigten eine veränderte ß-Untereinheit der RNA-Polymerase, die mit für die Bindung an die DNA Matrize verantwortlich ist. Offenbar ist mutationsbedingt die DNA Affinität der RNA Polymerase geändert worden.

Wirtsmutanten, die die Translation der mRNA betreffen, sind von Chakrabarti und Gorini (23) isolierte ribosomale Mutanten von E. Coli. Diese zeigen ebenfalls einen spezifischen Einfluß auf die Expression der Gene des F tra-Operons und der pif Gene. Die Donatorfunktion dieser Stämme zeigte sich 10^4 bis 10^7fach erniedrigt. Jedoch scheint die vom tra-Operon determinierte Surface Exclusion Funktion bei diesen Mutanten nicht betroffen zu sein.

Die von P. Silverman als resistent gegen den F-Pilus spezifischen Phagen Qß isolierten Cpx Mutanten sind Tra^- und zeigen starke Membrandefekte. Aufgrund der Phänotypen und der teilweise erfolgten genetischen Charakterisierung erscheinen diese unterschiedlich von den in dieser Arbeit behandelten sfr Mutanten zu sein. Möglicherweise ist eine Gruppe der in dieser Arbeit untersuchten Mutanten identisch mit von Schnegg und Kaudewitz (86) isolierten Mutanten. Jedoch wurden diese genetisch und phänotypisch nicht eingehend genug beschrieben, um eine eindeutige Aussage zur Identität vorzunehmen.

In dieser Arbeit werden zwei Klassen von chromosomalen Mutanten, sfrA und sfrB (sex-factor-regulation) beschrieben, die weitere Hinweise über den Einfluß von Wirtsfunktionen in der Konjugation geben. Die Isolierung und eine beginnende genetische Charakterisierung der sfr Mutanten ist bereits in (15) vorgenommen worden.

In der vorliegenden Arbeit sind weiterführende Untersuchungen beschrieben, die Aufschlüsse über die Funktion dieser Wirtsfaktoren im Konjugationsprozeß bei E. Coli K-12 geben sollen.

2. Material und Methoden

2.1 Medien

Die zur Durchführung der Arbeit erforderlichen Medien sind beschrieben. Soweit es möglich war, erfolgte die Sterilisation durch Autoklavieren, ansonsten durch Sterilfiltration.

2.1.1 Flüssige Medien

Als unselektives Vollmedium diente L-Broth (67).
Zur Zusammensetzung werden zu 1000 ml bidest[a] H_2O, 10 g Bacto Tryptone (Difco), 5 g Yeast Extract (Difco), 10 g NaCl und ein Plätzchen NaOH gegeben.

Als Puffer zur Herstellung von Minimalmedium diente Medium 56 (77). Es besteht aus 612 ml 0,1 M Na_2HPO_4; 389 ml 0,1 M KH_2PO_4; 2,0 ml 10 % $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 20,0 ml 10 % $(NH_4)_2SO_4$; 1,0 ml 1 % $Ca(NO_3)_2$ und 1,0 ml 0,05 % $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$.

Als flüssiges Minimalmedium diente Medium 56/2, daß mit den erforderlichen Zusätzen supplementiert und eine Mischung aus Medium 56 und bidest H_2O im Verhältnis 1 : 1 ist.

D Medium wurde für Verdünnungen benutzt. Es ist eine Mischung aus L-Broth und Medium 56/2 im Verhältnis 1 : 1.

Zitratmedium (60) diente als Minimalmedium für P1 Transduktionen. Seine Zusammensetzung besteht aus einer 50fachen Verdünnung der Stammlösung: (2860 ml bidest H_2O; 40 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 400 g Zitronensäure $\cdot\, H_2O$; 2000 g 99 % K_2HPO_4 und 700 g $NaNH_4HPO_4 \cdot H_2O$) in bidest H_2O.

---

[a] bidestilliertes

K Medium (77) diente zur Aufzucht von E. Coli B zur Gewinnung von T7 Lysaten. Es besteht aus 1000 ml 2 x M9 Medium (92); 1000 ml 1,5 % Caseinhydrolysat; 0,2 ml 1 M $MgSO_4$; 4 ml 25 % NaCl ; 20 ml Thiamin (2 mg/ml) und 20 ml Thymin (2 mg/ml).

ADS (60) (Adsorptionsmedium) wird zum Titrieren von P1 benötigt. Es besteht aus einer 0,005 M $CaCl_2$ und 0,01 M $MgSO_4$ Lösung in bidest H_2O.

3 x ADS ist dreifach konzentriertes ADS und wird bei P1 Transduktionen verwendet.

Casamino-Glyzerol Medium wurde zur Gewinnung von λ Lysaten herangezogen (84). Es besteht aus Medium 56/2 plus 1 % Casaminosäuren, 0,2 % Glyzerin und 1 µg/ml Thiamin.

2.1.2 Feste Medien

Als Vollmediumnährböden dienten L-Platten. (L-Broth plus 2 % Agar).

EMB-Platten (Eosin-Methylenblau) (93) dienen als Indikatorplatten, auf denen die Eigenschaft von Bakterien, einen hinzugegebenen Zucker als Kohlenstoffquelle verwerten zu können, angezeigt wird. Die Zusammensetzung dieser Platten besteht aus einem Liter bidest H_2O ; 10 g Bacto-Tryptone (Difco) ; 1 g Yeast-Extract (Difco) ; 5 g NaCl ; 2 g K_2HPO_4 und 20 g Agar (Difco). Nach dem Autoklavieren werden 10 ml 4 % Eosingelb, 10 ml 0,65 % Methylenblau und 50 ml einer 20 %igen Lösung des zu testenden Zuckers hinzugegeben.

Minimalplatten werden aus supplementiertem Medium 56, das mit geschmolzenem 4 % Agar im Verhältnis 1 : 1 gemischt ist, hergestellt.

Acridine Orange "Curing" Platten (32) dienen zum selektiven Verhindern der Replikation des F-Faktors. Die Zusammensetzung besteht aus: 1000 ml bidest H_2O plus 25,5 g

Antibiotic Medium 2 (Difco). Nach dem Autoklavieren wird der pH dieser Lösung auf 8,5 mit 1 N NaOH eingestellt und 50 ml 20 % Lactose, 5 ml 1 % TTC (2; 3; 5-Triphenyl-Tetrazolium Chlorid) und 15 ml 5 % Acridine Orange hinzugegeben.

Zitratminimalplatten werden bei P1 Transduktionen benötigt. Sie bestehen aus einer Mischung von 2fach konzentriertem Zitratminimalmedium und 4 % Agar (Difco) im Verhältnis 1 : 1.

Schwarmplatten (13) dienen zum Testen der Motilität von Bakterien. Sie bestehen aus L-Broth plus 0,35 % Agar.

LC Platten (60) setzen sich aus einem Liter bidest H_2O, 0,10 g Agar (Difco), 10 g Bacto Tryptone (Difco), 5 g NaCl und 5 g Yeast Extract (Difco) zusammen. Nach dem Autoklavieren werden 2,5 ml 40 % Glucose, 4 ml 0,25 % Thymidin, 5 ml 0,5 M $CaCl_2$ und 4,0 ml 1 M $MgSO_4$ hinzugegeben.

LC-Top Agar (60) besteht, bezogen auf einen Liter bidest H_2O, aus 10 g Bacto Tryptone (Difco), 5 g NaCl, 5 g Yeast Extract (Difco) und 7 g Agar (Difco).

Für P1-Lysate wurde der geschmolzene Top-Agar mit $CaCl_2$ (0,005 M Endkonz.) und $MgSO_4$ (0,01 M Endkonz.) supplementiert.

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid (Eastman Kodak, USA)

Adenosin-3' : 5'-monophosphat (cyclisch) (Boehringer, Mannheim)

Aminosäuren (Calbiochem, San Diego, USA)

Chloramphenicol (Calbiochem, San Diego, USA)

Coomassie brilliant blue G250 (Serva, Heidelberg)

Kanamycin (Beohringer, Mannheim)

Laktose (Eastman Kodak, USA)

N-N' Methylen Bis-Acrylamid (Bio-Rad, Calif., USA)

Nalidixinsäure (Schwarz/Mann, Orangeburg, New York, USA)

Purin und Pyrimidinbasen (Calbiochem, San Diego, USA)

SDS (Sodium Lauryl Sulfat) (BDH Chemicals, Poole, England)

Spectinomycin (Mycofarm Delft, Holland)

Streptomycin (Serva, Heidelberg)

Tetracyclin (Calbiochem, San Diego, USA)

TMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin) (Serva, Heidelberg)

Zucker (Sigma, St. Louis, USA, bzw. Merck,Darmstadt)

Alle übrigen, nicht einzeln aufgeführten Chemikalien, stammen von Merck, Darmstadt.

2.2 Bakterien

Alle in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind Abkömmlinge von Escherichia Coli K-12; mit der Ausnahme, daß zur Gewinnung von T-Phagen und C21 Lysaten ein Escherichia Coli B Stamm verwendet wurde. Zur Isolierung der in dieser Arbeit behandelten sfr$^-$ Mutanten (15) diente der Stamm M176. Dieser Stamm ist ein Flac (JCFLO) tragendes Derivat von JC3272 (9).

Zur Beschreibung der Phänotypen der sfr Mutanten dienten Flac und UCR105 tragende Derivate dieser Stämme. Der R-Faktor UCR105 ist ein dereprimiertes Derivat von R100 (48) und trägt die Gene zur Tetrazyklinresistenz.

Um einen F$^-$ Stamm mit einem gewünschten Plasmid zu versehen, dienten folgende Donatoren: M176 oder JC5484 für Flac, E205 für Fgal, M1240 für Ftrp und M869 für UCR105. Falls es aus Selektionsgründen erforderlich war, wurden Nal^r Derivate der Rezipienten angelegt (2.6.1). In Kreuzungen zur quantitativen Messung des Transfers (2.3.1) fun-

gierten als Rezipienten in der Regel M1213 und JC5455.

In Kreuzungen zur Ermittlung der Surface Exclusion Fähigkeit (2.3.4) wurde der Hfr KL98 verwendet.

Als Ausgangsstamm zur genetischen Analyse (3.2.2) und Komplementation (3.3.1) der sfrA Mutanten diente C600, aus dem der Stamm M1986 entwickelt wurde.

Für die genetische Kartierung (3.2.3) und Komplementationsanalyse (3.3.3) der sfrB Mutanten dienten die Ausgangsstämme IO7011 und FOS-3, aus denen der Stamm M3960 entwickelt wurde.

Zum Anlegen von recA$^-$ Derivaten der sfr Mutanten in der Komplementationsanalyse wurden die Hfr's KL16-99 beziehungsweise JC10240 verwendet.

Die R- und Col-Faktoren, die in Ergebnisse 3.4.1 verwendet wurden, sind in 2.2.1 gesondert aufgeführt.

Zur Transformation der sfr Mutanten mit pRS31 DNA (Ergebnisse 3.6.1) wurde als DNA Spender der Stamm M1889 verwendet.

Die Stammnummern der sfr Mutanten und ihrer Derivate sind der Übersichtlichkeit halber hier nicht aufgeführt. Zum Verständnis der Arbeit besteht dafür auch keine Notwendigkeit.

2.2.1 Stammliste

a) Donatoren und Rezipienten

Stammnummer	Plasmid	Phänotyp	Herkunft
M176	Flac	$B1^-$,His^-,Trp^-,Lys^-,Gal^-,$MalA^-$ Str^r,$T6^r$,$T1^r$	Flac in JC3272 (9)
M869	UCR105	wie JC3272	UCR105 in JC3272
M1213	ohne	wie JC5455 aber Nal^r	Derivat von JC5455
M1240	Ftrp	wie JC6650	Derivat von JC6650
M1379	ohne	Fla^-,Thy^-	Helmuth + Achtman (46)
M1889	pRS31	wie JC3272	M. Achtman (8)
M1986	Flac	Thr^-,Ara^-,Thy^-,Str^r,SuII	diese Arbeit
M2580	ohne	wie AB2463	diese Arbeit
M3960	Ftrp	His^-,Cya^-,$MetE^-$	diese Arbeit
JC3272	ohne	wie M176 aber Lac^-	Derivat von JC6589 (9)
JC5455	ohne	$B1^-$,His^-,Trp^-,$T1^r$,$T6^r$,Spc^r Lac^-	Derivat von JC6589 (9)
JC5484	Flac	wie JC5455	Flac in JC5455
JC1553	KLF33	$ArgG^-$,$MetB^-$,His^-,Leu^-,$RecA^-$ Mtl^-,Xyl^-,$MalA^-$,Gal^-,Lac^-,Str^r	K.B. Low
AB2463	KLF1	Thr^-,Leu^-,$B1^-$,$ArgE^-$,His^-,$ProA^-$ $RecA^-$,$LacY^-$,$GalK^-$,Mtl^-,Xyl^-, Ara^-,Str^r	K.B. Low
C600	ohne	Thr^-,Leu^-,Lac^-,Str^r,$SuII^+$	A.H. Reiner (80)
E205	Fgal	$B1^-$,Thr^-,Leu^-,Trp^-,His^-,Arg^- Lac^-,Xyl^-,Man^-,Mal^-,$T1^r$,Str^r	Hirota + Sneath (47)
FOS-3	ohne	$B1^-$,Ilv^-,Rbs^-,Bgl^-,Cya^-,Nal^r Lac^-	M. Malamy
IO7011	ohne	Trp^-,His^-,$MetE^-$,Ilv^-	J. Beckwith
PC1349	ohne	Thr^-,Leu^-,$ProA^-$,His^-,$B1^-$,Arg^- Lac^-,Gal^-,Xyl^-,Mtl^-,Ara^-,Str^r Tg^r,Phx^r,Rec^-	B. Lugtenberg

b) Hfr's

Stammnummer	Transferierungsstartpunkt (a)	Phänotyp	Herkunft
CA7033 (H)	99'	Lac^-Pro^-	W. Brammar
JC10240	61'-62'	srl::tn10,Tet^r Thr^-,Ilv^-,$B1^-$ Spc^r,Rel^-,$RecA^-$	A.J. Clark
KL16-99	61'-62'	$B1^-$,$RecA^-$	K.B. Low
KL98	50'	prototroph	K.B. Low
KL228	83'	$B1^-$,Leu^-,Gal^- Lac^-,$SuII^+$	K.B. Low
P72	85'	$MetB^-$	B. Bachmann

(a) Der Transferierungsstartpunkt ist bezogen auf die E. Coli Genkarte (14)

c) R- und Col Faktoren

Plasmid	Resistenzen (a)	Incompatibilitätsgruppe	Herkunft
RA1	TSu (a)	A	N. Datta
R40a	AKSu	C	N. Datta
R55	ASCKG	C	N. Datta
ColV2	ColV	FI	N. Willetts
R1-19	C	FII	E. Meynell
ColVBtrp	ColVB	FI	N. Willetts
R538-1 O^c	C	FII	N. Willetts
ColB4	ColB	FIII	N. Willetts
R124	T	FIV	N. Datta
R27	T	H	N. Datta
R64drd11	ST ColI	I	N. Datta
R446b	ST	M	N. Datta
N3	STSu	N	N. Datta
R16	ASTSu	O	N. Datta
RP	ATK	P	N. Datta
Rts-1	K	T	N. Datta
S-a	SCKSu	W	N. Datta
R478	TCK	S	N. Datta
R479b-1	STSu	S	N. Datta

(a) Abkürzungen: A=Ampicillin,T=Tetrazyklin,C=Chloramphenicol,K=Kanamycin, Su=Sulphonamide,S=Streptomycin,ColX=Produzent und resistent gegen ColX

2.3 Genetische Methoden

2.3.1 Quantitativer Transferierungstest

Der quantitative Transferierungstest dient zur vergleichenden Analyse des Transferierungsverhaltens von Sex-Faktor tragenden Bakterienstämmen.

Die Durchführung ist von Achtman et al. (8, 9) eingehend beschrieben worden.

Die Transferierungsfähigkeit der einzelnen Stämme wird als Prozentwert vom Kontrollstamm ausgedrückt.

2.3.2 Qualitativer Transferierungstest

Dieser Test dient zur Untersuchung einer größeren Anzahl von Einzelkolonien auf ihre Transferierungsfähigkeit. Die Durchführung erfolgt mit Hilfe der Replika-Plattierung der Donatorenkolonien auf einen Rezipientenrasen und ist von Achtman et al. (8, 9) beschrieben worden.

2.3.3 F-Pilus spezifischer Phagensensitivitätstest

Dieser Test gibt Aufschluß über das Vorhandensein von F-Pili an Bakterien. Zum Test wurde der an F-Pili adsorbierende Bakteriophage M12 verwendet. Zum Test von R100-1 Pili der Phage f2.

Bei der Durchführung werden die zu testenden Kolonien von ihren Ursprungsplatten auf EMB-Platten, auf die vorher 0,1 ml eines M12 oder f2 Lysates (10^{11} pfu/ml) aufgetragen wurde, Replika-plattiert und bei 37° inkubiert. Eine EMB Kontrollplatte ohne Phagen wird zum Vergleich angelegt. Nach 4-6 Stunden Inkubation zeigen sich die phagensensitiven Kolonien durch schlechtes Wachstum und tiefrote Färbung, während die resistenten hochgewachsen sind und weiß aussehen. Zum Erkennen der Farbveränderung

muß dieser Test in einem abgedunkelten Raum unter reflektiertem Licht durchgeführt werden.

2.3.4 Quantitativer Surface Exclusion Test und Ermittlung des Surface Exclusion Index (SEI)

Die Durchführung der Hfr Kreuzungen für den quantitativen Surface Exclusion Test ist von Achtman et al. (9) eingehend beschrieben worden.

Zur Ermittlung des SEI eines F^+ Teststammes wird die Zahl der Rekombinanten, die von ihm in einer Hfr Kreuzung erzielt werden, durch die Zahl der Rekombinanten eines F^- Kontrollstammes aus der gleichen Kreuzung dividiert. Der Quotient entspricht dem SEI des F^+ Teststammes. Der SEI des F^- Kontrollstammes wird gleich 1 gesetzt.

Normalerweise liegt die Rezipientenfähigkeit eines Wildtyp F^+ Stammes aufgrund der Surface Exclusion Gene des tra-Operons etwa 100-300fach niedriger als die des Wildtyp F^- Stammes.

2.4 Bakteriophagen

2.4.1 Bakteriophagenlysate

Mit Ausnahme von C21 und P1 Lysaten wurden generell Flüssigkeitslysate hergestellt (11).

Die Methode zur Gewinnung von M12 und f2 Lysaten ist von Achtman et al. (9) beschrieben, ebenso wie die Methode zur Gewinnung von P1Kc Schlämmlysaten, die von Willetts und Achtman (97) entnommen wurde.

Lysate des Flagellaphagen χ wurden, wie von Schade und Adler (84) beschrieben, in Casamino-Glyzerol Medium gezogen. Als Stamm zur Gewinnung dieser Lysate diente PC1349.

2.4.2 "Spot-Tests"

"Spot Tests" dienen zur Ermittlung der Phagensensitivität eines zu testenden Bakterienstammes.

Zur Durchführung werden von den Testbakterien bei 37° Übernachtkulturen angelegt. Am folgenden Tag wird je 0,1 ml einer Übernachtkultur zu 2,5 ml supplementierten, geschmolzenen LC Top-Agar gegeben, vermischt und auf eine L Platte aufgetragen. Ein Tropfen des Lysates eines zu testenden Bakteriophagen wird auf die festgewordene Top-Agar Schicht gegeben. Sensitivität zeigt sich nach über Nacht Inkubation der Platte als Lyse (Plaquebildung). Resistenz offenbart sich durch ungestörtes Wachstum.

2.4.3 Phagentitrationen (Efficiency of Plating)

Phagentitrationen dienen zur quantitativen Erfassung der Bakteriophagensensitivität von Bakterien. Hierbei wird der zu testende Bakteriophage auf einem sensitiven Wirtsstamm titriert und der Titer gleich 1 gesetzt (E.O.P.).

Um die E.O.P. eines zu testenden Stammes für diesen Bakteriophagen zu ermitteln, wird der Titer, der mit diesem Bakteriophagen auf dem Teststamm erzielt wird, durch den des sensitiven Stammes geteilt und somit die Plattierungseffizienz des Phagen auf dem Teststamm im Vergleich zu Kontrolle errechnet.

2.5 Genetische Kartierungsmethoden

2.5.1 Hfr Kreuzungen

Hfr Kreuzungen wurden zur genetischen Kartierung der sfr$^-$ Mutanten und zur Durchführung von Surface-Exclusion Versuchen unternommen. Hierbei wurde eine von Achtman (2) eingeführte Methode angewandt. Von einer Übernachtkultur des Hfr's in L-Broth wird eine exponentiell bei 37° bis

$\sim 2 \times 10^8$ Zellen/ml wachsende, unbelüftete Kultur angelegt. 0,5 ml dieser Kultur werden mit 0,5 ml eines exponentiell belüftet gewachsenen Rezipienten ($2-3 \times 10^8$ Zellen/ml) gemischt und 20 Minuten in L-Broth bei 37° vorgewärmtes L-Broth verdünnt und die Kreuzung fortgesetzt. Die Kreuzungsdauer richtet sich nach dem Abstand des zu selektionierenden Markers vom Transferierungsstartpunkt des Hfr's (siehe E. Coli Karte).

Der Abbruch der Kreuzung zum gewünschten Zeitpunkt erfolgt mit einem von B. Low (64) entwickelten Schüttler. Zum Erhalt der Rekombinanten wird eine Verdünnungsreihe der Kreuzung auf selektiven Minimalplatten angelegt, die 1-2 Tage bei 37° inkubiert werden.

Die sfr$^+$ Rekombinanten wurden durch Einkreuzen eines Flac und dem darauffolgenden Test auf M12 Sensitivität und dem qualitativen Tra-Test unter der Gesamtzahl der Rekombinanten erkannt.

2.5.2 P1 Transduktion

Die Durchführung der Methode der P1 Transduktion ist von Yanofsky und Lennox (103) und Willetts und Achtman (97) eingehend beschrieben und daher hier nicht aufgeführt.

Als selektive Minimalplatten für Extransduktanten dienen Zitratplatten, die eine weitere P1 Adsorption verhindern. Die nach 1-2 Tagen auf diesen Platten hochwachsenden Extransduktanten werden, wie in 3.1 beschrieben, auf ihren Sfr Phänotyp getestet.

2.5.3 Komplementationstest

Komplementationsanalysen werden durchgeführt, um Mutationen auf ihre Dominanz/Rezessivität und ihre cistronische Anordnung zu prüfen. In Ergebnisse 3.3 ist der Komplementationstest mit den sfrA und sfrB Mutanten eingehend

beschrieben.

Für die Komplementationsanalyse wurden von KLF1 (für sfrA) beziehungsweise von KLF33 (für sfrB) Rekombinanten isoliert, die anstelle des Wildtyppallels sfr^+ den jeweiligen sfrA beziehungsweise sfrB Marker des Wirtsstammes tragen.

Zum Komplementationstest selbst werden die KLF1 und die KLF33 Rekombinanten in $recA^-$ F^- $sfrA^-$ beziehungsweise $sfrB^-$ Rezipienten eingekreuzt und die so konstruierten Stämme im quantitativen Transferierungstest (2.3.1) und auf F-Pilus spezifische Phagensensitivität (2.3.3) geprüft.

Der Test, ob echte Rekombination des sfr^- Markers auf dem F' vorliegt, wird folgendermaßen durchgeführt: Da die sfr^- Mutationen rezessiv sind (3.3), sind sfr^- Mutanten, die einen komplementierenden Wildtyp F' tragen, Tra^+ und $M12^S$. Die Rekombinanten auf dem F' werden als Tra^- $M12^r$ Phänotypen isoliert. Um zu prüfen, ob unter diesen der F' noch autonom vorliegt, werden diese Stämme auf Acridin Orange "Curbarkeit" (2.6.4) des F' getestet. Wird die "Curbarkeit" eines solchen Stammes bestätigt, so wird der in ihm befindliche F' in einen F^-, sfr^+ Rezipienten eingekreuzt und der Tra^+, $M12^S$ Charakter dieses konstruierten Stammes geprüft. Im Falle von Tra^+ und $M12^S$ Eigenschaft wird der getestete F' als echter sfr^- Rekombinant betrachtet.

Durch diese Kontrolle sind in das Chromosom integrierte oder in den Genen des tra-Operons veränderte F' von echten sfr^- F' Rekombinanten unterscheidbar.

2.6 Allgemeine genetische Methoden

2.6.1 Isolierung von Nal^r Stämmen

Zur Isolierung wird je 0,1 ml einer stationären Kultur des Ausgangsstammes auf eine supplementierte Minimalplatte, die 25 µg/ml Naledixinsäure enthält, aufgetragen. Nal^r Spontanmutanten wachsen nach 1-2 Tagen Inkubation bei 37° hoch.

2.6.2 Isolierung von Thy^- Stämmen

Die Substanz Trimethoprim (TMP) inhibiert in Dosen von 50 µg/ml selektiv das Wachstum von Thy^+ Bakterien. Thy^- Zellen wachsen jedoch mit TMP und Thymin (50 µg/ml) im Medium ungehindert. Mit dieser, von Okada et al. (76) entwickelten Methode konnten Thy^- Bakterien auf Platten mit TMP und Thymin angereichert werden. Der Test auf den Thy^- Charakter der hochgewachsenen Kolonien erfolgte durch Replika-Plattierung auf Minimalplatten ohne Thymin. Thy^- Bakterien können auf solchen Platten nicht wachsen, da sie mindestens 20 µg/ml Thymin benötigen (62).

2.6.3 Isolierung von $recA^-$ Derivaten der sfrA und sfrB Komplementationsstämme

$RecA^-$ Stämme von den sfrA Mutanten wurden wie folgt isoliert:
Die thy^-,sfrAx (F^-) Mutanten (3.3.1) wurden mit Hfr KL16-99 ($recA^-$,thy^+) gekreuzt. Hierbei wurden thy^+ Str^r Rekombinanten selektioniert. Unter diesen fanden sich 22,5 % (Mittelwert) $recA^-$ Rekombinanten. Diese wurden durch erhöhte UV Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp und dem Ausbleiben von Rekombinanten in einer Hfr Kreuzung erkannt.

Solche Stämme dienten nach Bestätigung ihres sfrA$^-$ Phänotyps als Rezipienten zum Aufbau der Komplementationsteststämme. RecA Derivate der sfrB Mutanten wurden auf eine ähnliche Weise isoliert. Hierzu wurden die F$^-$,sfrBx Stämme (3.3.4) mit dem Hfr JC10240 (recA$^-$,Tet^r) gekreuzt. Dieser Hfr trägt ein Transposon, das für Tetrazyklin-Resistenz codiert, in der engen Nachbarschaft des recA Gens. Rekombinanten aus solchen Kreuzungen wurden als Tet^r isoliert. Unter den Tet^r Rekombinanten fanden sich 90-95 % recA$^-$ Typen. Diese wurden, wie oben beschrieben, auf ihren recA$^-$ Charakter getestet. Nach Bestätigung ihres sfrB Phänotyps dienten sie zum sfrB Komplementationstest.

2.6.4 Acridine Orange "Curing"

Die Substanz Acridine Orange kann zur Selektion gegen F$^+$ Zellen verwendet werden, wobei gleichzeitig F$^-$ Bakterien angereichert werden (Curing).

Hierzu werden Bakterien aus einer Flac$^+$ Kultur auf Acridine Orange Platten ausgestrichen und 2-3 Tage bei 37° vor Licht geschützt inkubiert. Die "gecurten" (F$^-$) Zellen erscheinen dann auf diesen Platten als weiße Kolonien, während die F$^+$ Kolonien rot erscheinen.

2.6.5 Transformation

In Ergebnisse 3.8.1 wurde die Transformation mit pRS31 DNA beschrieben.

Zur Durchführung diente die von S.N. Cohen et al. (25) beschriebene Methode zur Transformation von E. Coli K-12. Da diese Methode in (25) ausführlich beschrieben ist, wird sie hier nicht aufgeführt.

2.6.6 Motilitätstest

Die Durchführung des Motilitätstestes als Parameter der Schwimmfähigkeit von Bakterien ist von Armstrong et al. (13) beschrieben worden und hier nicht aufgeführt.

2.6.7 Antibiotika Sensitivitätstest

Die Durchführung und Auswertung dieser Tests ist von Hancock und Reeves (39) ausführlich beschrieben worden und daher hier nicht aufgeführt.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Membranisolation

Die Methode zur Isolierung von Membranen von E. Coli K-12 ist von Achtman et al. (6) veröffentlicht und ist hier anfolgend beschrieben:
Hierzu werden in 100 ml L-Broth bei 37° unter Belüftung die Zellen des gewünschten Stamms bis zum Titer von 4×10^8 Bakterien/ml hochgewachsen. Danach werden die Bakterien durch Zugabe von Eis möglichst schnell abgekühlt und in einem Sorvall GSA Rotor 10 Minuten bei 10400 g (4°) zentrifugiert und in 10 ml TES Puffer: (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Durch Ultraschallbehandlung (M.S.E. Ultrasonic Disintegrator, Meas. & Scient. Equipment Ltd., London) für 4 x 30 sec, mit Zwischenpausen von 30 sec, bei 0° werden die Zellen zertrümmert. Die unzerstörten Zellen werden durch Zentrifugation (Sorvall SS34 Rotor, 20 Minuten, 755 g, 4°) sedimentiert. Aus dem Überstand, der Membranen und Cytoplasma enthält, wird durch eine weitere Zentrifugation (Sorvall SS34 Rotor, 60 Minuten, 482 g, 4°) das Membranpellet vom Cytoplasma getrennt. Zum Aufbewahren wird die Membranprobe aus 100 ml Zellen in 0,3 ml bidest H_2O resuspendiert und bei -30° eingefroren.

2.7.2 SDS-Gelelektrophorese der Membranpräparationen

Diese von Achtman et al. (6) beschriebene Methode stellt eine Modifikation des Lugtenberg Systems (66) dar. Es wurden 11-20 % lineare Gradientengele (Acrylamid/Bisacrylamid) hergestellt. Die Zusammensetzung eines normalen (9 cm langen) Gels ist anfolgend beschrieben. Für lange Gele (18 cm) wurden doppelte Mengen der Stammlösungen verwendet. Die Größe eines normalen Gels beträgt 9 cm x 14,5 cm x 0,12 cm.

Substanz	11 % Stammlösung	20 % Stammlösung
10 % Ammoniumpersulfat	19 µl	19 µl
"Stock 1" (44 g Acrylamid + 0,8 g Bisacrylamid auf 100 ml bidest H_2O	2,37 ml	4,52 ml
10 % SDS (eine 1 : 1 Mischung von SDS 30175 und SDS 30176 BDH Poole (England)	0,17 ml	0,17 ml
0,75 M Tris-Cl pH 8,8	4,75 ml	4,75 ml
Bidest H_2O	2,27 ml	0,22 ml
TMED	3 µl	3 µl

Beide Stammlösungen wurden kurz vor der Gelaufbereitung hergestellt und intensiv entgast. Die mit 4 % Agar versiegelten Gelplatten wurden mit einer peristaltischen Pumpe (Gilson, Minipuls 2, Frankreich) an die ein Gradientenmischer angeschlossen war, aufgefüllt. Zur Polymerisation wurden die Gele mit je 3,5 ml 0,1 % SDS Gemisch überschichtet.

Vor der Benutzung wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer befestigt und mit 4 % Agar abgedichtet. Danach wurde das Gel mit einem 5 %igem Sammelgel überschichtet.

Zusammensetzung: 10 % Ammoniumpersulfat (12 µl), "Stock 2" (30 g Acrylamid + 0,8 g Bisacrylamid) auf 100 ml bidest H_2O (0,83 ml) und 10 µl TMED. Vor dem Auftragen wurde diese Gellösung intensiv entgast. Zum Einbringen der Proben in das Sammelgel wurden mit Hilfe eines Gelkammes Vertiefungen eingebracht. Vor dem Aufbringen der Proben (Probenpuffer: 0,125 M Tris-Cl pH 6,8 , 4 % SDS 1 : 1 , 17,4 % Glyzerin, 10 % Mercaptoäthanol und 0,005 % Bromophenolblau in bidest H_2O) wurden die Gelkammern mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Zusammensetzung: 25 mM Tris-Cl; 1, 43 % Glycin; 0,1 % SDS 1 : 1 Mischung, der pH wurde auf 8,3 mit HCl eingestellt. Die fertige Probe wurde zwei Minuten im Wasserbad gekocht und 10-20 µl pro Spur aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wurde bei 50 Volt durchgeführt, bis die Probenfront das Sammelgel erreicht hatte. Danach wurden die Gele 4-5 Stunden auf 150 Volt gebracht, bis der blaue Farbstoff in die untere Kammer austrat. Lange Gele (18 cm) liefen 17 Stunden bei 135 Volt und wurden nach Austritt des Farbstoffes eine Stunde bei 200 Volt belassen.

Die Gele wurden über Nacht bei Zimmertemperatur mit 0,06 % Coomassie Blue G-250 in 3,5 % Perchlorsäure gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 5 % Essigsäure für 1-2 Tage.

2.8 Immunbiologische Methoden

2.8.1 F-Pilus Präzipitationstest

Hierzu wurde eine von Helmuth (46) entwickelte Methode verwendet. Die Antiserumgewinnung und die Durchführung des Tests ist in (46) ausführlich beschrieben.

2.9 Elektronenoptische Methoden

2.9.1 Präparationen für die Elektronenmikroskopie

Für F-Pili und Flagellenuntersuchungen wurde die Bakterienkultur in L-Broth bei 37° belüftet bis zur mittleren exponentiellen Phase des Wachstums hochgezogen.

Bei F-Pili Untersuchungen wurde zu einem Milliliter dieser Kultur 0,08 ml 35 %iges, filtriertes Formaldehyd und 0,1 ml eines filtrierten M12 Lysates (Titer 1×10^{11} pfu/ml) gegeben.

Für Flagellauntersuchungen wurden zu einem Milliliter Kultur 0,1 ml eines filtrierten χ Phagen-Lysates (Titer 1×10^{11} pfu/ml) gegeben und zehn Minuten weiterinkubiert, um die Adsorption der Phagen an den Geißeln zu gewährleisten. Danach wurde 0,08 ml 35 %iges filtriertes Formaldehyd zur Fixierung hinzugegeben.

Proben für die Elektronenmikroskopie wurden sofort und nach über Nacht Sedimentation des Bakterien/Phagen Komplexes entnommen. Nach über Nacht Sedimentation können größere Zellkonzentrationen untersucht werden und der größte Teil der M12 Phagen ist an den F-Pili gebunden, wodurch diese sichtbar markiert sind.

2.9.2 Elektronenmikroskopie

Hierzu wurde mit einer Drahtöse eine Teilmenge einer Probe entnommen und auf ein mit Kohle bzw. Formvar beschichtetes Netz aufgetragen. Durch eine Filterpapierunterlage wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt. Nach dem Trocknen wurde das Netz zweimal in bidest H_2O gewaschen und in 2 % Phosphorwolframsäure pH 7,7 oder 1,5 % Uranylacetat pH 4,0 angefärbt. Die Präparate wurden in einem Phillips Elektronenmikroskop (Typ EM301) elektronenoptisch ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung der sfrA und sfrB Mutanten

3.1.1 Ziel der Mutantenisolierung

Die Isolierung und eine beginnende genetische Charakterisierung der chromosomalen sfr⁻ Mutanten ist schon in (15) ausführlich beschrieben und daher hier nicht aufgeführt. Das Ziel war es, Mutanten von Escherichia Coli K-12 zu gewinnen, die einen pleiotropen Effekt auf die Expression der Gene des tra-Operons von zwei Sex-Faktoren, Flac und R100-1, zeigen.

Dieser Mutationseffekt soll sich auf den DNA-Transfer, das Surface Exclusion Verhalten und die Synthese von F-Pili auswirken.

Aus Verständnisgründen ist Tabelle 1, die auch in (15) beschrieben wurde und die phänotypischen Eigenschaften der Mutanten zeigt, hier aufgeführt.

Ziel dieser Arbeit war eine genauere genetische und funktionelle Analyse der isolierten sfr⁻ Mutanten.

3.1.2 Eigenschaften der sfr⁻ Mutanten

Zur Beschreibung der Eigenschaften dieser Mutanten mußte ihr Einfluß auf Funktionen des tra-Operons quantitativ gemessen werden. Die Methoden hierzu sind in (9, 15) ausführlich beschrieben worden.

In Tabelle 1 sind die Resultate der quantitativen Tests mit den Sex-Faktoren Flac und R100-1 aufgeführt.
Die Gliederung der Tabelle erfolgt nach der genetischen Kartierung (3.2) der Mutanten in sfrA und sfrB.
Die phänotypische Gruppierung erfolgt nach der jeweiligen Stärke des Mutationseinflusses und nach Spezifität innerhalb der Gruppen I-V.

Tabelle 1 Phänotypische Eigenschaften der sfr⁻ Mutanten

Mutation	Transferierung in % vom Wildtyp (a)		Surface Exclusion Index (a)		F-Pilus spezifische Phagensens. (a)	F^+ spezifische ØII Restriktion	Phänotypische Gruppierung
	Flac	R100-1	Flac	R100-1	Flac bzw. R100-1	Flac	
sfr⁺	100,0	100,0	390,0	33,7	sensitiv	0,5	
sfrA4	3,7	0,1	3,8	8,1	resistent	4,8	
sfrA7	3,2	0,03	3,5	6,0	resistent	5,3	I
sfrA10	2,8	0,02	2,6	12,4	resistent	2,7	
sfrA8	0,3	$\leq 2 \times 10^{-4}$	12,0	10,6	resistent	$\leq$ 0,04	
sfrA9	0,1	$\leq 2 \times 10^{-4}$	9,0	11,7	resistent	$\leq$ 0,04	II
sfrA5	0,06	0,01	19,5	7,4	resistent	0,89	
sfrB1	17,0	2,9	6,4	12,8	resist./sensitiv (b)	< 0,04	III
sfrB3	7,1	0,16	5,2	6,7	resistent	32,3	IV
sfrB11	0,02	$\leq$ 0,02	12,6	5,2	resistent	50,8	
sfrB14	8,5	0,01	10,5	11,2	resistent	< 0,04	
sfrB2	2,0	0,03	7,1	5,2	resistent	0,01	V
sfrB13	0,98	0,03	3,5	5,8	resistent	0,12	

(a) siehe Material und Methoden

(b) nicht voll resistent

Aus den Eigenschaften der Mutanten und der Komplementationsanalyse (3.3) geht hervor, daß keine der Mutationen seinen totalen Einfluß auf die Funktionen des tra-Operons besitzt. Dies wird auch im Vergleich mit tra$^-$ Mutationen innerhalb der Gene des tra-Operons deutlich (9).

Neben den Funktionen des tra-Operons beeinflussen zwei Mutanten, sfrB3 und sfrB11, stark die F-spezifische Restriktion des Bakteriophagen ØII (99). Die Gene für diese Funktion liegen auf dem F-Faktor außerhalb des tra-Operons (89).

Jedoch werden offenbar nicht alle F Gene durch die sfr$^-$ Mutanten beeinflußt. So konnte kein qualitativer Einfluß auf die Replikationsfunktionen der untersuchten Plasmide in den sfr$^-$ Mutanten festgestellt werden.

Darüber hinaus konnte wie beim Wildtyp, in Membranproteinanalysen ein F-spezifisches Protein, das nicht vom tra-Operon codiert wird (4), unverändert auch bei den sfr$^-$ Mutanten gefunden werden (3.5.3).

3.2 Genetische Kartierung der sfrA und sfrB Mutanten (siehe auch Chromosomkarte)

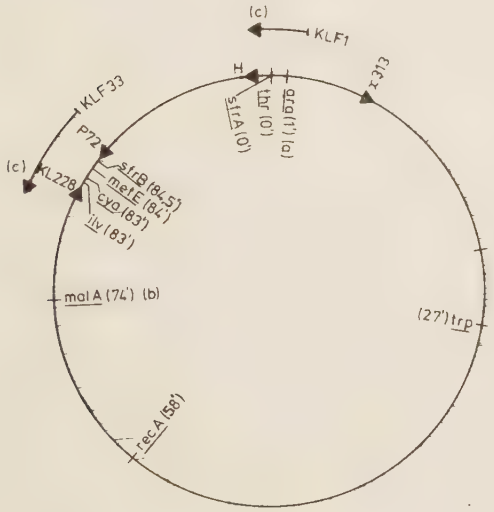
In (15) wurde bereits gezeigt, daß zwei genetisch unterschiedliche Gruppen der sfr$^-$ Mutanten vorliegen.

Die eine Gruppe, sfrA, wurde durch Hfr Kreuzungen (2.5.1) und P1 Transduktion (2.5.2) in der Nachbarschaft des thr Genortes auf dem Chromosom bestimmt.

Die andere Gruppe, die SfrB genannt wurde, wurde der Chromosomenabschnitt zwischen den Transferierungsstartpunkten der Hfr's P72 und KL228 zugeordnet.

Die in dieser Arbeit weiterführende genetische Kartierung zur Definition des sfrA und sfrB Cistrons erfolgte mit P1 Drei-Faktor Kreuzungen und dem Komplementationstest (3.3).

Schematische Darstellung des E.coli K-12 Chromosoms nach Bachmann et al. (14)



Legende ◄— bezeichnet den Transferierungsstartpunkt des jeweiligen Hfr's.

(a) Genbezeichnung
(b) Kartierungsposition in Minuten
(c) F'Faktoren

3.2.1 Bestimmung der Genfolgen zwischen den sfrA und sfrB Mutanten in bezug zu jeweils zwei bekannten Genmarkern

Um eine genaue genetische Kartierung der sfrA und der sfrB Mutanten durchzuführen, wurden P1 Drei-Faktor Kreuzungen durchgeführt.

Hierbei wird die Rekombinationshäufigkeit des jeweiligen sfr Markers mit zwei ihm benachbarten, selektionierbaren Markern ermittelt. Aus den Austauschhäufigkeiten der drei Marker läßt sich so eine lineare Genfolge ermitteln.

Eine direkte Selektion auf den sfr Marker konnte nicht durchgeführt werden.

3.2.2 Kartierung der sfrA Mutanten mit P1 Drei-Faktor Kreuzungen

Zur Kartierung der sechs sfrA Mutanten wurden die beiden selektionierbaren, sfrA benachbarten Marker thr (0/100') und ara (1') verwendet. Von C600 ara^+, thr^+, $sfrA^-$ Derivaten wurden P1 Lysate hergestellt, mit denen der Rezipientenstamm M1986 thr^-, ara^-, $sfrA^+$, $Flac^+$ transduziert wurde.

Die Selektion erfolgte in einem Fall auf Thr^+ Extransduktanten, im anderen Fall auf Ara^+ Extransduktanten. In beiden Fällen wurde die Kotransduktion der unselektionierten Marker gemessen (siehe Tabelle 2).

Genkopplungsmessungen ergaben eine Kotransduktionshäufigkeit zwischen thr und sfrA von 95 %. Durch die enge Nachbarschaft der beiden Marker konnte eine Genfolge thr-ara-sfrA ausgeschlossen werden.

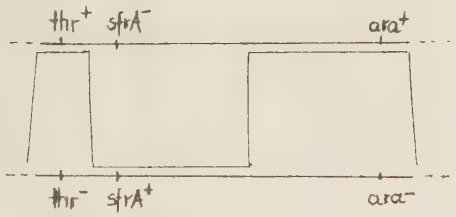
Von den verbliebenen Genfolgen, thr-sfrA-ara bzw. sfrA-thr-ara konnte die richtige nicht ermittelt werden, da der ara und der thr Marker zu weit voneinander entfernt sind, um eine Unterscheidung der Rekombinantentypen vornehmen zu können.

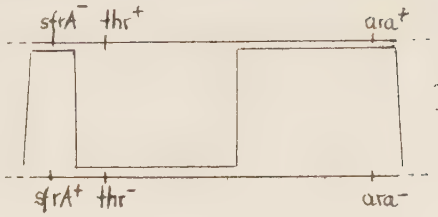
Tabelle 2 P1 Drei-Faktor Kreuzungen zur Kartierung der sfrA Mutanten

Selektion: Ara^+

Mögliche Rekombinanten	Anzahl der Rekombinanten						Zahl der Crossover für	
	sfrA4	sfrA5	sfrA7	sfrA8	sfrA9	sfrA10	Genfolge A	Genfolge B
(Ara^+) Thr^- $SfrA^+$	213	233	281	216	200	271	2	2
" Thr^+ $SfrA^-$	79	109	85	117	113	66	2	2
" Thr^- $SfrA^-$	4	5	7	10	6	5	2	4
" Thr^+ $SfrA^+$	4	3	7	7	1	8	4	2
Summe	300	300	300	300	300	300		

A





B

Selektion: Thr^+

Mögliche Rekombinanten	Anzahl der Rekombinanten						Zahl der Crossover für	
	sfrA4	sfrA5	sfrA7	sfrA8	sfrA9	sfrA10	Folge A	Folge B
(Thr^+) Ara^- $SfrA^-$	281	284	277	277	286	279	2	2
" Ara^+ $SfrA^-$	6	3	7	3	1	9	2	2
" Ara^- $SfrA^-$	13	13	16	20	13	12	2	2
" Ara^+ $SfrA^+$	0	0	0	0	0	0	4	2
Summe	300	300	300	300	300	300		

Erklärung siehe Text

3.2.3 Kartierung der sfrB Mutanten mit P1 Drei-Faktor-Kreuzungen

Zur Kartierung aller sechs sfrB Mutanten mit P1 Drei-Faktor-Kreuzungen wurden die beiden selektionierbaren, sfrB benachbarten Genmarker cya-(83') und metE (84') herangezogen. Der Rezipientenstamm M3960 Ftrp$^+$, cya$^-$, metE$^-$ wurde mit P1 Lysaten, die auf allen sechs sfrB Mutanten in JC3272 Derivaten gezogen worden waren, transduziert. Bei der Transduktion erfolgte die Selektion in einem Fall auf Cya$^+$ Extransduktanten, um die Rekombination des jeweiligen sfrB Markers und des metE Markers zu bestimmen. In dem anderen Fall erfolgte die Selektion auf metE$^+$, und die unselektionierten Marker cya und sfrB wurden untersucht.

Die Ergebnisse dieser Transduktion sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. In dieser Tabelle werden nur zwei mögliche Genfolgen, cya-sfrB-metE und cya-metE-sfrB diskutiert. Die dritte mögliche Genfolge sfrB-cya-metE konnte experimentell ausgeschlossen werden (15).

Für die beiden in Tabelle 3 angegebenen möglichen Genanordnungen sind die jeweils entsprechenden 4fach Crossover Rekombinanten aufgezeichnet. Nach den in Tabelle 3 ersichtlichen Rekombinantenzahlen zeigt sich die Genfolge cya-metE-sfrB als die richtige an. Dies wird bestätigt durch den Vergleich der Genkopplungshäufigkeiten zwischen cya-sfrB (0,01) und cya-metE (0,16). Hierdurch zeigt sich, daß der metE Marker dem cya Marker näher liegt als die sfrB Mutationen.

3.3 Komplementations- und Rekombinationsanalyse der sfrA und sfrB Mutanten

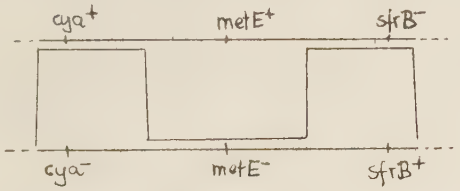
Mit Hilfe der Komplementationsanalyse soll festgestellt werden, ob verschiedene Mutationen sich in einem oder mehreren Cistren befinden. Hierzu werden jeweils zwei zu untersuchende Mutationen im heterozygoten Zustand auf Komplementation (Wiederherstellung der Wildtypfunktion)

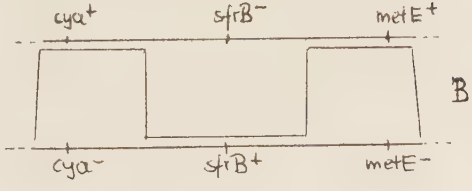
Tabelle 3 P1 Drei-Faktor Kreuzungen zur Kartierung der sfrB Mutanten

Selektion: Cya$^+$

Mögliche Rekombinanten	Anzahl der Rekombinanten						Zahl der Crossover für	
	sfrB1	sfrB2	sfrB3	sfrB11	sfrB13	sfrB14	Genfolge A	Genfolge B
(Cya$^+$) metE$^-$ sfrB$^+$	173	168	165	167	163	173	2	4
" metE$^+$ sfrB$^+$	26	29	34	29	35	26	2	2
" metE$^+$ sfrB$^-$	1	3	1	4	2	1	2	2
" metE$^-$ sfrB$^-$	0	0	0	0	0	0	4	2
Summe	200	200	200	200	200	200		

A





B

Selektion: MetE$^+$

Mögliche Rekombinanten	Anzahl der Rekombinanten						Zahl der Crossover für	
	sfrB1	sfrB2	sfrB3	sfrB11	sfrB13	sfrB14	Genfolge A	Genfolge B
(Met$^+$) cya$^+$ sfrB$^+$	105	87	104	80	113	100	2	4
" cya$^-$ sfrB$^-$	54	47	46	61	21	31	2	2
" cya$^-$ sfrB$^+$	38	50	34	42	40	47	2	2
" cya$^+$ sfrB$^-$	3	15	16	17	26	22	2	2
Summe	200	200	200	200	200	200		

Erklärung siehe Text

geprüft. Komplementation liegt vor, wenn in solchem Fall die Wildtypfunktion wiederhergestellt wird, denn dann liegen die Gene in verschiedenen Cistrons.

3.3.1 Komplementationsanalyse der sfrA Mutanten

Für die Komplementationsanalyse wurden aus der genetischen Kartierung (3.2.2) entstandene Rekombinanten (M1986 ara$^-$, sfrA$^-$) verwendet. Diese wurden mit Acridin Orange von ihrem Flac "gecurt" (2.6.4), so daß F$^-$ Derivate gewonnen wurden. In die F$^-$ Stämme wurde mit Hilfe des Donators AB2463 das F' Plasmid KLF1 (Chromosomenkarte) eingekreuzt, welches die Genmarker ara$^+$, sfrA$^+$ trägt.

Von allen sechs sfrA Mutanten wurden somit KLF1 tragende Stämme gewonnen, welche auf Komplementation des chromosomalen sfrA$^-$ Markers mit dem sfrA$^+$ Marker des KLF1 getestet wurden. Als Testkriterien galten der quantitative Transferierungstest (2.3.1) und der M12 Sensitivitätstest (2.3.3), wobei das Plasmid für den Test der KLF1 selbst darstellte.

Als Ergebnis wurde bei allen sechs sfrA Mutanten gegenüber dem Wildtypallel sfrA$^+$ Rezessivität festgestellt. Dies zeigte sich durch Wiederherstellung der Transferierungsfähigkeit und der M12 Sensitivität dieser Stämme.

Um eine Komplementationsanalyse innerhalb der sechs sfrA Mutanten durchzuführen, war es erforderlich, Rekombinanten der KLF1 tragenden sfrA Mutanten zu isolieren, die einen jeweiligen sfrA Marker homozygot auf dem KLF1 und dem Chromosom tragen (2.5.3). Eine solche KLF1/sfrA Rekombinante kann dann in alle sechs sfrA Mutanten eingekreuzt werden, um den Komplementationstest durchzuführen.

Im vorliegenden Fall wurden mit sfrA4 auf KLF1 (pBE501) und sfrA10 auf KLF1 (pBE502) Rekombinanten isoliert. Diese Rekombinanten zeigen in ihren Wirtsstämmen den in 3.1.2 beschriebenen SfrA Phänotyp.

Tabelle 4 Komplementationsanalyse der sfrA Mutanten in rec$^+$ und rec$^-$ Derivaten

Teststamm F'/Chromosom	recA$^+$ % Transferierung von Kontrolle	recA$^-$ % Transferierung von Kontrolle	M12	Komplementation
sfrA4/sfrA4	0,8	0,2	r[a]	nein
sfrA4/sfrA5	0,4	0,1	r	nein
sfrA4/sfrA7	0,9	0,2	r	nein
sfrA4/sfrA8	0,04	0,3	r	nein
sfrA4/sfrA9	0,5	0,1	r	nein
sfrA4/sfrA10	0,6	0,07	r	nein
sfrA4/sfr$^+$	(100,0)	(100,0)	s[b]	ja
sfrA10/sfrA4	1,3	0,4	r	nein
sfrA10/sfrA5	0,2	1,2	r	nein
sfrA10/sfrA7	0,8	0,4	r	nein
sfrA10/sfrA8	0,9	0,2	r	nein
sfrA10/sfrA9	0,5	0,2	r	nein
sfrA10/sfrA10	1,6	0,6	r	nein
sfrA10/sfr$^+$	(100,0)	(100,0)	s	ja

[a] resistent

[b] sensitiv

Erklärung siehe Text

Aus Selektionsgründen wurde pBE501 bzw. pBE502 über den Zwischenwirt M2580 in die M1986 F^-, ara$^-$, sfrA$^-$ Derivate eingekreuzt. Außerdem wurden von den M1986 F^-, ara$^-$, sfrA$^-$ Stämmen recA$^-$ Derivate isoliert (2.6.3), in die ebenfalls pBE501 bzw. pBE502 eingekreuzt wurden. Für die Komplementationsanalyse haben recA$^-$ Stämme den entscheidenden Vorteil, daß Rekombination zwischen den F' und dem Wirtschromosom nicht stattfindet.

Die Ergebnisse der Komplementationsanalyse mit allen sechs Mutanten sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß weder die Transferierungsfähigkeit noch die M12 Sensitivität sowohl in rec$^+$ und recA$^-$ Derivaten der Komplementationsstämme wiederhergestellt wird. Danach findet keine Komplementation statt, und die sechs sfrA Mutationen können einem Cistron zugeordnet werden.

3.3.2 Rekombination zwischen den sechs sfrA Mutanten

Bei den Komplementationstestkreuzungen in Tabelle 4 wurden als Rezipienten Nal^r F^- Derivate der Mutanten sfrA4 und sfrA10 verwendet. Die erzielten Exconjuganten jeder Kreuzung wurden nach zwei Kriterien untersucht:

a) Tritt im Fall der Kreuzungen mit den rec$^+$ Komplementationsstämmen Rekombination zwischen dem sfrA Marker des KLF1 und dem sfrA Marker des Chromosoms auf?

b) Werden nur sfr$^+$ KLF1 Rekombinanten transferiert?

Da in den Kreuzungen ein sfrA Rezipient verwendet wurde, sind Exconjuganten, die einen KLF1 erhalten haben, der zum sfr$^+$ Wildtyp rekombiniert ist, als M12 sensitiv erkennbar. Exconjuganten, die einen KLF1, der sfrA$^-$ ist, tragen, sind dagegen M12 resistent.

Die Ergebnisse zur Rekombinationsanalyse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5 Rekombinationsanalyse der sfrA Mutanten in recA$^+$ Stämmen

Teststamm F'/Chromos.	Rezipient	Zahl der unters. Exconjuganten	Rekombinanten	% Rekombinanten
sfrA4/sfrA4	sfrA10	48	0/48	< 2,08 %
sfrA4/sfrA5	"	100	8/100	8,0 %
sfrA4/sfrA7	"	100	0/100	≤ 1,0 %
sfrA4/sfrA8	"	100	1/100	1,0 %
sfrA4/sfrA9	"	100	12/100	12,0 %
sfrA4/sfrA10	"	100	0/100	≤ 1,0 %
sfrA4/sfr$^+$	"	100	1/100	1,0 %

Nur in den Fällen von sfrA4/sfrA5, sfrA4/sfrA8, sfrA4/sfrA9 und sfrA4/sfr$^+$ konnte Rekombination zum Wildtyp nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Werten sind jedoch nicht so groß, daß für die anderen sfrA Mutationen mit der Ausnahme von sfrA4 selbst Rekombination mit sfrA4 auszuschließen ist. Eindeutig konnte gezeigt werden, daß nicht ausschließlich KLF1 sfr$^+$ Rekombinanten transferiert werden, sondern überwiegend pBE501 Typen. Damit zeigt sich, wie in 3.1 besprochen, daß der Mutationscharakter der sfrA Mutanten keinen totalen Einfluß auf die Transferierungsfunktionen besitzt.

Darüber hinaus zeigt das Auftreten von Rekombinanten innerhalb des sfrA Cistrons, daß bei der Isolierung von pBE501 tatsächlich die sfrA4 Mutation auf dem F' vorliegt und keine Deletion, die keine Rekombination zeigen würde, für das sfrA Cistron auf dem F' vorhanden ist.

3.3.3 Komplementations- und Rekombinationsanalyse der sfrB Mutanten

Aus den Drei-Faktor Kreuzungen zur Kartierung der sechs sfrB Mutanten entstanden M3960 Derivate, die cya$^-$, sfrB$^-$ waren. Der in diesen Stämmen befindliche Ftrp wurde mit

Acridin Orange (2.6.4) ausselektiert und F^- Derivate dieser Stämme gewonnen. In diese F^- Derivate wurde der F' KLF33 (Chromosomenkarte), der den Chromosomenabschnitt von ilv (83') bis argH (88') überdeckt, eingkreuzt. Als Selektion diente der cya^+ Marker von KLF33, der dominant über den cya^- Marker des $sfrB^-$ Rezipienten ist.

Somit wurden von allen sechs sfrB Mutanten KLF33 tragende Derivate gewonnen, die auf ihren SfrB Phänotyp getestet wurden. Hierbei erwies sich das $sfrB^+$ Allel des KLF33 als dominant über alle sechs sfrB Mutationen in den Rezipientenstämmen. Als Untersuchungskriterium wurde der quantitative Transferierungstest und der M12 Sensitivitätstest verwendet.

Für die Komplementationsanalyse innerhalb der sechs sfrB Mutanten wurden, wie in 3.3.1 beschrieben, KLF33 Rekombinanten isoliert, die homozygot sfrB13 bzw. sfrB14 waren (2.5.3). Von den sechs sfrB M3960 F^- Derivaten wurden in einer Kreuzung mit Hfr JC10.240 (Stammliste) isogene $recA^+$ und $recA^-$ Stämme erzeugt.

In diese Stämme wurde der sfrB13 KLF33 (pBE503) und der sfrB14 KLF33 (pBE504) Rekombinant eingekreuzt, um die Teststämme für die Komplementationsanalyse zu erhalten. Die Ergebnisse der Komplementationsanalyse mit den sechs sfrB Mutanten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß mit allen sechs sfrB Mutanten weder die Transferierungsfähigkeit noch die M12 Sensitivität gegenüber den Werten in Tabelle 1 signifikant in diesen Komplementationsstämmen erhöht wird. Demnach findet keine Komplementation innerhalb der sechs sfrB Mutanten statt. Alle sechs Mutanten können somit einem Cistron, sfrB, zugeordnet werden.

Tabelle 6 Komplementationsanalyse der sfrB Mutanten in rec$^+$ und recA Derivaten

Teststamm F'/Chromosom	recA$^+$ % Transferierung von Kontrolle	M12	recA$^-$ % Transferierung von Kontrolle	Komplementation
sfrB13/sfrB1	4,6	r/s[a]	6.5	nein
sfrB13/sfrB2	0,01	r[b]	0,004	nein
sfrB13/sfrB3	0,05	r	0,003	nein
sfrB13/sfrB11	0,1	r	0,001	nein
sfrB13/sfrB13	0,1	r	0,2	nein
sfrB13/sfrB14	0,3	r	0,003	nein
sfrB13/sfr$^+$	(100,0)	s[c]	(100,0)	ja
sfrB14/sfrB1	24,4	r/s	19,4	nein
sfrB14/sfrB2	0,06	r	0,06	nein
sfrB14/sfrB3	0,12	r	1,1	nein
sfrB14/sfrB11	0,8	r	0,45	nein
sfrB14/sfrB13	2,8	r	1,1	nein
sfrB14/sfrB14	1,3	r	2,3	nein
sfrB14/sfr$^+$	(100,0)	s	(100,0)	ja

[a] nicht voll resistent [b] resistent [c] sensitiv

Erklärung siehe Text

3.3.4 Rekombination zwischen den sechs sfrB Mutanten

Aus den in 3.4.2 dargelegten Gründen war es notwendig, die Rekombination innerhalb der sechs sfrB Mutanten zu untersuchen. Aus Selektionsgründen wurde für die dazu erforderlichen Kruezungen ein Nal^r sfrB14 Rezipient verwendet. Die Ergebnisse der Rekombinationsanalyse der sfrB Mutanten sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7 Rekombinationsanalyse der sfrB Mutanten in reA^+ Stämmen

Teststamm KLF33sfrB13/Chrom.	Rezipient	Zahl der unters. Exconjuganten	Rekombinanten	% Rekombinanten
sfrB13/sfrB1	sfrB14	100	1/100	1 %
sfrB13/sfrB3	sfrB14	23	0/23	≦ 4,3 %
sfrB13/sfrB11	sfrB14	46	8/46	17,4 %
sfrB13/sfrB13	sfrB14	100	0/100	≦ 1 %
sfrB13/sfrB14	sfrB14	100	10/100	10 %
sfrB13/sfr^+	sfrB14	100	44/100	44 %

Hierbei zeigen die Mutationen sfrB13/sfrB1, sfrB13/sfrB11, sfrB13/sfrB14 und sfrB13/sfr^+ Rekombination untereinander. In der Kombination sfrB13/sfrB2 konnte Rekombination nicht untersucht werden, da keine Exconjuganten aus der Kreuzung vorlagen. Im Fall sfrB13/sfrB13 fand erwartungsgemäß keine Rekombination statt.

Auch im Fall der sfrB Mutanten konnte gezeigt werden, daß nicht ausschließlich sfr^+KLF33 Rekombinanten transferiert werden. Daher kann auch im Fall der sfrB Mutanten, wie in 3.1 diskutiert, ein absoluter Einfluß der sfrB Mutationen auf die Funktionen der tra^- Gene ausgeschlossen werden.

Ebenso ist, wie in 3.3.2 erklärt, durch das Rekombinationsexperiment ausgeschlossen, daß der F' pBE503 eine Deletion des sfrB Cistrons trägt.

3.4 Untersuchungen zum Wirkungsbereich der sfrA und sfrB Mutanten

Die hierzu erfolgenden Tests sollten Aufschlüsse über die Abhängigkeit von einander verschiedener Sex-Faktoren von den sfrA und sfrB Genen liefern, um somit die Spezifität dieser Wirtsfaktoren bestimmen zu können.

3.4.1 Einfluß der sfrA und sfrB Mutationen auf andere transferierbare Plasmide

Zur Beschreibung der Phänotypen der sfrA und sfrB Mutanten (3.2) wurden die Untersuchungen nur an zwei F-ähnlichen (71) Sex-Faktoren durchgeführt. Für diese weitergehende Untersuchung wurden F, R- und Col-Faktoren aus fünfzehn Incompatibilitätsgruppen (Stammliste) in jeweils einen sfrA bzw. sfrB Rezipienten eingekreuzt und das Transferierungsverhalten dieser Stämme mit der sfr^+ Kontrolle verglichen. Das Ziel der Untersuchung war es, einen Aufschluß über den Wirkungsbereich der sfrA und sfrB Mutanten zu erhalten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Aus der Tabelle 8 ist zu entnehmen, daß nicht alle untersuchten Sex-Faktoren durch die sfrA und sfrB Mutationen beeinflußt werden. Alle F-ähnlichen, untersuchten Sex-Faktoren zeigen sich jedoch durch die sfrA und sfrB Mutationen beeinflußt, mit der Einschränkung, daß ColV2 (FI) nur von sfrA und R1-19 (FII) nur von sfrB beeinflußt wird. Darüber hinaus werden jeweils zwei Plasmide der Incompatibilitätsgruppen S (R478, R479b-1) und C (R40a, R55) durch das sfrB Cistron in ihrer Transferierbarkeit bestimmt. Das ist insofern bemerkenswert, da Plasmide dieser beiden Incompatibilitätsgruppen keine bisher bekannten Gemeinsamkeiten mit F-ähnlichen Sex-Faktoren haben (29, 44). Die Transferierungswerte einiger betroffener Sex-Faktoren sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 8 Wirkungsbereich der sfrA und sfrB Mutationen auf verschiedene Sex-Faktoren

Gruppe I Eigenschaft: weder von sfrA noch von sfrB beeinflußt	Gruppe II Eigenschaft: von sfrA beeinflußt, aber nicht von sfrB	Gruppe III Eigenschaft: von sfrB beeinflußt, aber nicht von sfrA	Gruppe IV Eigenschaft: von sfrA + sfrB beeinflußt
1 2			
RA1 (A)	ColV2 (FI)	R1-19 (FII)	Flac (FI)
R27 (H)		R55 (C)	ColVBtrp (FI)
R64drd11 (Iα)			R538-10^{C} (FII)
R446 b (M)		R40a (C)	ColB4 (FIII)
N3 (N)		R478 (S)	R124 (FIV)
R16 (O)		R479b-1 (S)	
RP4 (P)			
RP4 (P)			
Rts-1 (T)			
S-a (W)			

1) Bezeichnung des Plasmids

2) Incompatibilitätsgruppe

weitere Erklärung im Text

Tabelle 9 Transferierungsdaten einiger von sfrA und sfrB beeinflußter Sex-Faktoren

Teststamm	%Transferierung von Kontrolle (sfr$^+$) der Plasmide:							
	1 Flac 2 (FI)	ColV2 (FI)	R100-1 (FII)	ColB4 (FIII)	R124 (FIV)	R1-19 (FII)	R478 (S)	R40a (C)
sfrA8	0,3	≦ 2,1	≦ 0,002	≦ 6,8	0,009	85,0	78,1	184,0
sfrB13	1,0	70,4	0,03	≦ 4,2	0,9	0,66	1,4	2,2
sfr$^+$	(100,0)	(100,0)	(100,0)	(100,0)	(100,0)	(100,0)	(100,0)	(100,0)

1) Bezeichnung des Plasmids

2) Bezeichnung der Incompatibilitätsgruppe

Erklärung siehe Text

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß der Einfluß der sfrA und sfrB Mutationen nicht allgemein auf Transferierungssysteme von verschiedenen Plasmiden wirkt, sondern nur das Konjugationsverhalten einer bestimmten Gruppe von Sex-Faktoren beeinflußt. Die F-ähnlichen und die Sex-Faktoren der Incompatibilitätsgruppen C und S bilden dabei eine Klasse von transferierbaren Plasmiden, die die Wirtsprodukte sfrA und bzw. sfrB zur Konjugation erfordert.

Darüber hinaus zeigt sich ein unterschiedlicher Aktionsmechanismus zwischen sfrA und sfrB, was durch spezifischen Einfluß auf bestimmte Gruppen transferierbarer Plasmide gezeigt wird.

3.5 Membranspezifische Effekte der sfrB Mutanten

Verschiedene bisher erfolgte Untersuchungen haben gezeigt, daß die Funktion der bakteriellen Membran eine entscheidende Rolle beim Konjugationsprozeß spielt (siehe Einleitung).

Im vorliegenden Fall wurden mit verschiedenen Methoden die Membranfunktionen der sfrA und sfrB Mutanten untersucht, um einen möglicherweise über die Membran wirkenden Mutationseinfluß erkennen zu können. Die anfolgenden Kapitel stellen verschiedene Testkriterien zur Funktion der Membran der sfrA und sfrB Mutanten dar.

3.5.1 Auswirkungen der sfrA und sfrB Mutationen auf das Bakteriophagensensitivitätsmuster von E. Coli K-12

Ein vom Wildtyp abweichendes Bakteriophagensensitivitätsmuster kann Hinweise auf bakterielle Membranveränderungen, bei denen Phagenrezeptoren mit betroffen sind, liefern (39, 61). Im Fall der sfrA und sfrB Mutanten wurde die Möglichkeit einer Membranveränderung untersucht, da eine Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung des Mutationsphänotyps durch eine veränderte Membran, ähnlich wie bei Con$^-$

Mutanten bestand. Außerdem kann geprüft werden, ob vom sfrA oder sfrB Genprodukt nicht nur die Expression des tra-Operons, sondern auch die Entwicklung bestimmter Bakteriophagen abhängig ist.

Als Phagensensitivitätstests dienten "Spot Tests" (2.4.2) und Phagentitrationen (2.4.3) auf den zu untersuchenden Stämmen. Die Ergebnisse der Spot-Tests sind in Tabelle 10, die Phagentitrationen in Tabelle 11 zusammengefaßt. Hierbei sind vor allen Dingen die Ergebnisse mit den Phagen C21 und U3 aufschlußreich. Beide Phagen finden ihren Rezeptor im Lipopolysaccharidteil der bakteriellen Zellmembran (78, 93). Jedoch sind nur E. Coli K-12 Stämme U3 empfindlich (93) und C21 resistent (54), während E. Coli B Stämme U3 resistent und C21 empfindlich sind (93, 54). Dies wird aus der unterschiedlichen LPS Komposition der

Tabelle 10 Bakteriophagensensitivität der sfrA und sfrB Gruppe

Gruppe	Phagen	sfr$^+$	Teststämme sfrA4+sfrA5	Teststämme sfrB11+sfrB13
I	T3	P(1)	P	S(2)
II	U3	S	S	R(3)
	C21	R	R	S
III	T1,T2,T4,T6(4) T7,BF23,Ø12(4) K3(4), λ (4)	S	S	S

Fußnoten:
1) partiell empfindlich
2) sensitiv
3) resistent
4) diese Gruppe von Phagen konnten auf den sfrB Repräsentanten nicht getestet werden, da der Parentalstamm resistent gegen diese Phagen ist.

Tabelle 11 Phagentitrationen mit T3, U3 und C21 auf sfrA und sfrB Repräsentanten

Teststamm	Plattierungseffizienzen der Phagen T3	U3	C21
sfrA4	$< 6{,}9 \times 10^{-5}$	0,61	nicht getestet
sfrA5	$< 6{,}9 \times 10^{-5}$	0,32	$< 5{,}8 \times 10^{-11}$
sfrB11	0,73	$< 7{,}5 \times 10^{-7}$	1,16
sfrB13	1,46	$< 7{,}5 \times 10^{-7}$	nicht getestet
sfr^+	$< 6{,}9 \times 10^{-5}$	(1)	$< 5{,}8 \times 10^{-11}$
E. Coli B	(1)	$< 7{,}5 \times 10^{-7}$	(1)

E. Coli K-12 und E. Coli B Stämme erklärt (19, 78, 93). Das veränderte Sensitivitätsmuster der Mutanten sfrB11 und sfrB13 deutet auf eine Änderung der LPS Komposition der sfrB Mutanten hin, wodurch diese C21 sensitiv und U3 resistent werden. Sensitivität zu C21 und Resistenz zu U3 wurde bei Escherichia Coli K-12 für gewisse gal^- Mutationen (78, 93) beschrieben. Daher wurden von den sfrA und sfrB Mutanten und dem sfr^+ Kontrollstamm in JC3272 Derivaten (Stammliste) auch Fgal tragende Derivate dieser Stämme getestet. Hierbei zeigte sich keine Änderung des beschriebenen Sensitivitätsmusters, mit der Ausnahme, daß die C21 Plaquemorphologie der Fgal tragenden sfrB Mutanten trüber war als in gal^- Derivaten, jedoch die E.O.P. unverändert blieb.

Einen weiteren Hinweis für die Möglichkeit der Änderung der LPS Komposition im Fall der sfrB Mutanten liefert das T3 Sensitivitätsmuster. Der Rezeptor dieses Phagen befindet sich ebenfalls in der LPS Schicht (39). Hierbei wird durch die Einführung der sfrB Mutation der ursprüng-

lich T3 partiell resistente Wirtsstamm wieder voll T3 empfindlich. Um eine endgültige Aussage über eine Veränderung der Membran-Rezeptoren der untersuchten Phagen zu erteilen, müssen Adsorptionsexperimente mit diesen Phagen an den sfrB Mutanten erfolgen.

Im Fall aller hier untersuchten Bakteriophagen zeigen die sfrA Repräsentanten, sfrA4 und sfrA kein vom sfr^+ Kontrollstamm abweichendes Sensitivitätsmuster, so daß aufgrund der Phagentests keine weiteren Aufschlüsse über den Charakter der sfrA Mutanten zu erhalten waren.

3.5.2 Auswirkungen der sfrB Mutationen auf die Transformierbarkeit und Antibiotikasensitivität der Wirtsstämme

Bei der Transformation der sfr^- Mutanten und der sfr^+ Kontrolle in (3.6.1) wurden mit den beiden Mutanten sfrB11 und sfrB13 13-20fach höhere Transformationseffizienzen gefunden als mit den sfrA Stämmen und der sfr^+ Kontrolle.

In Sensitivitätstests gegenüber Antibiotika (2.6.7) zeigten die sechs sfrB Mutanten deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber 10 µg/ml Chloramphenicol und 30 µg/ml Novobiocin, als die sfrA und sfr^+ Stämme. Das veränderte Antibiotikasensitivitätsmuster dieser Mutanten deutet ebenfalls auf einen Membraneffekt hin. LPS Mutanten mit gleichem U3 und C21 Phänotyp und erhöhter Sensitivität zu Novobiocin sind von Hancock und Reeves (39) beschrieben worden. Der erhöhten Transformierbarkeit der sfrB Mutanten könnte eine Membranveränderung zugrunde liegen, genauso gut können jedoch andere Wirtsfaktoren (Nukleaseaktivität) hierfür verantwortlich sein.

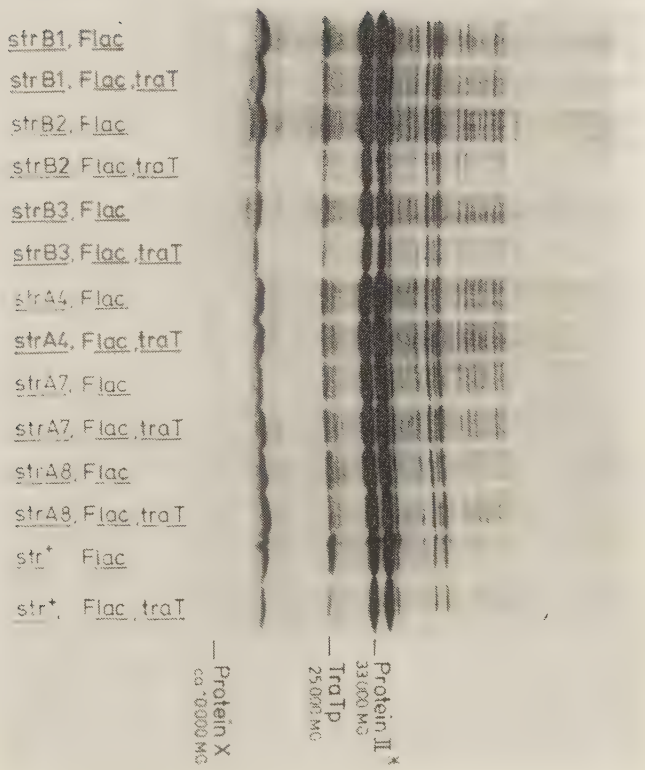
3.5.3 SDS-Gelelektrophoretische Untersuchung der Membranproteine der sfrA und sfrB Mutanten

Da aufgrund der Bakteriophagensensitivitätstests 3.5.1 der Verdacht bestand, daß zumindest die sfrB Gruppe der Mutanten mutationsbedingt eine Membranveränderung erfahren hat, wurden die Membranproteine aller sfr Mutanten und des Kontrollstammes mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (66) untersucht. Hierbei ist es möglich, Veränderungen des Proteinbandenmusters von isolierten bakteriellen Zellmembranen zu erkennen.

Neben chromosomal codierten Membranproteinen befindet sich bei F^+ Zellen der überwiegende Teil der vom tra-Operon codierten Proteine in der Zellmembran (55). Auf gefärbten SDS-Polyacrylamidgradientengelen (2.7.2) ist das vom tra-Operon codierte traT Protein, welches ein Teil des Surface Exclusion Systems darstellt, gut sichtbar (4). Da die sfrA und sfrB Mutanten einen pleiotropen Effekt auf die Funktionen des tra-Operons haben, kann die Stärke dieses Effekts am Beispiel der traT Synthese in den Mutanten gemessen werden.

Von allen sfrA und sfrB Mutanten und der sfr^+ Kontrolle wurden, von $Flac^+$ und $Flac^+traT247$ Stämmen, Gesamtzellmembranpräparationen hergestellt (2.7.1). Diese Präparationen wurden auf 9 cm hohen 11-20 % Polyacrylamidgradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbanden angefärbt. Abbildung 1 zeigt ein solches Gel. Von links nach rechts sind Gesamtmembranen von sfrB1, sfrB2, sfrB3, sfrA4, sfrA7, sfrA8 und der sfr^+ Kontrolle alternierend von $Flac^+$ und $Flac^+traT247$ Derivaten aufgetragen. Die Molekulargewichte einiger Hauptmembranproteine sind angezeigt. Da das traT Protein direkt über einem chormosomalen Membranprotein auf dem Gel läuft (4), ist seine quantitative Bestimmung durch Adsorptionsmessung erschwert. Jedoch kann mit allen Flac tragenden Mutanten der sfrA und sfrB Gruppe eine im Vergelich mit der sfr^+ Kontrolle geringere Menge von traT Protein auf Gelen nachgewiesen werden. Darüber hinaus

Abbildung 1


strB1, Flac
strB1, Flac, traT
strB2, Flac
strB2 Flac, traT
strB3, Flac
strB3, Flac, traT
strA4, Flac
strA4, Flac, traT
strA7, Flac
strA7, Flac, traT
strA8, Flac
strA8, Flac, traT
str+ Flac
str+, Flac, traT
Protein X
ca. 10000 MG
TraTp
25000 MG
Protein II*
33000 MG

zeigen die sfrB Repräsentanten im unteren Bereich des Gels einige Veränderungen, die anfolgend beschrieben werden:

Bei den sfrB Repräsentanten fehlt eine Bande im unteren Bereich des Gels, die im Vergleich mit bekannten Proteinen (Gel nicht gezeigt) ein Protein von etwa 10.000 MG darstellt (hier Protein X). Der untere Gelbereich wird vom LPS der Zellmembran eingenommen (P. Manning, pers. Mitteilung). Von der Molekülgröße und dem Gelbereich her könnte es sich um Braun's Lipoprotein handeln. Darüber hinaus zeigen sich bei den sfrB Repräsentanten zwei schwache Banden unterhalb der tiefsten starken Bande des Gels, wohingegen bei den sfrA Mutanten nur eine Bande sichtbar ist. Möglicherweise stellt eine Bande davon eine im sfrB veränderte Form des Protein X dar.

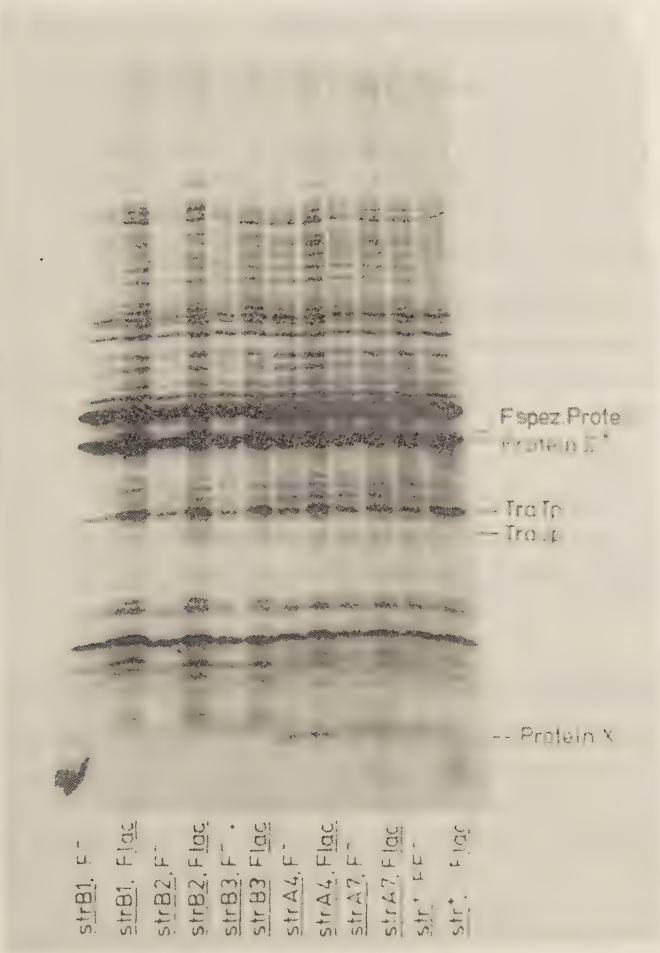
Da in keinem weiteren Bereich des Gels, mit Ausnahme des TraTp Unterschiede zwischen sfrA, sfrB und sfr^+ Proben zu finden sind, handelt es sich hierbei möglicherweise um die in 3.5.1 diskutierte LPS Veränderung der sfrB Mutanten.

Abbildung 2 zeigt ein 18 cm hohes, 11-20 % SDS-Polyacrylamidgradientengel. Auf Gelen dieser Länge können manche Proteine, die auf kurzen Gelen sich gegenseitig überdecken, aufgetrennt werden. Von links nach rechts sind Gesamtzellmembranproben der sfrB und sfrA Mutanten und der sfr^+ Kontrolle aufgetragen, jeweils nebeneinander von F^- und $Flac^+$ Derivaten.

Hierbei ist ein Flac Protein, das nicht vom tra-Operon codiert ist und auch bei anderen, F-ähnlichen Sex-Faktoren gefunden wurde (4), dicht über Protein II^* bei allen $Flac^+$ sfrA, sfrB und sfr^+ Stämmen sichtbar. Die Synthese dieses Proteins wird offenbar nicht sichtlich von den sfr^- Mutationen gestört, was ein zusätzlicher Hinweis ist, daß die sfrA und sfrB Mutationen nicht alle F-Funktionen beeinflussen (3.1.2).

Auch auf diesem Gel ist deutlich zu erkennen, daß die $Flac^+$, sfrA und sfrB Mutanten gewisse Mengen an traT Protein synthetisieren. Etwas unterhalb der TraTp Bande ist bei den

Abbildung 2


strB1, F⁻
strB1, Flac
strB2, F⁻
strB2, Flac
strB3, F⁻
strB3 Flac
strA4, F⁻
strA4, Flac
strA7, F⁻
strA7 Flac
str⁺ F⁻
str⁺ Flac
Protein X

Flac$^+$ Proben eine weitere Bande von etwa 23.000 MG sichtbar. Diese Bande konnte nur auf langen Gelen gezeigt werden. Erkennbar ist, daß Flac$^+$ sfrB Proben und die Flac$^+$ sfr$^+$ Kontrolle diese Bande zeigen, wohingegen sie in den Flac$^+$ sfrA Präparaten und allen F$^-$ Membranen nicht auftaucht. Auf anderen Gelen (nicht gezeigt) konnte diese Eigenschaft für alle sechs sfrB und sfrA Mutanten gezeigt werden.

Bei diesem Protein handelt es sich wahrscheinlich um das traJ Produkt, ein Protein, das größtenteils Membrangebunden ist und 23.500 MG hat (55). Jedoch müßte die endgültige Bestätigung im Vergleich mit einer traJ$^-$ Mutante erfolgen.

Ein unterschiedlicher Effekt der sfrA und sfrB Mutanten auf die TraJp Synthese ließe auf eine unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Cistren auf das tra-Operon schließen. Hinweise dazu ergeben sich auch an anderer Stelle (3.4.1; 3.5.1).

Wie zuvor bei Abbildung 1 beschrieben, zeigen sich auch bei diesem Gel Unterschiede des Bandenmusters im unteren Gelbereich, die auf eine LPS Änderung hindeuten.

3.6 Untersuchungen zur F-Pilus Bildung der sfrA und sfrB Mutanten

Bei der Beschreibung der Phänotypen der sfrA und sfrB Mutanten (3.1) wurde ein pleiotroper Mutationseffekt auf die Funktionen des tra-Operons festgestellt. Insofern war es erforderlich, die von der Funktion des tra-Operons abhängige F-Pilus Bildung (45) in diesen Mutanten zu untersuchen.

Als Vorversuch zur quantitativen F-Pilus Bestimmung wurden die Flac tragenden Mutanten sfrA4, sfrA5, sfrB11, sfrB13 und sfr$^+$ Kontrollstamm mit F-Pilus Antiserum behandelt (2.8.1). Hierbei war Präzipitation nur im Fall der sfr$^+$ Kontrolle erfolgt, während die untersuchten sfr Mutanten nicht präzipitierten. Dies ist ein Hinweis, daß wenn, nur wenige F-Pili von den Mutanten synthetisiert werden.

Zur quantitativen F-Pilus Bestimmung (46) wurden Flac Derivate der Mutanten sfrA4, sfrA5, sfrB11, sfrB13 und des sfr^+ Kontrollstammes zur elektronenoptischen Untersuchung vorbereitet (2.9.1) und von mindestens 100 Zellen pro Stamm die Zahl der F-Pili bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Tabelle 12 Bestimmung der F-Pili Zahl von sfrA und sfrB Mutanten

Teststamm	F-Pili	0	1	2	3	4	% F-Pili tragende Zellen
sfrA4 ($Flac^+$)		105	0	0	0	0	<0,9
sfrA5 ($Flac^+$)		105	0	0	0	0	<0,9
sfrB11 ($Flac^+$)		103	2	0	0	0	1,9
sfrB13 ($Flac^+$)		79	17	4	0	0	21,0
sfr^+ ($Flac^+$)		24	54	16	4	2	76,0

Aus den in Tabelle 12 zusammengefaßten Untersuchungen geht hervor, daß sowohl die sfrA als auch die sfrB Mutationen unter anderem auch eine starke Einschränkung der F-Pilus Synthese bewirken. Hingegen scheint die Synthese der chromosomal codierten filamentartigen Fimbrien (17, 68) elektronenoptisch nicht sichtbar in den sfrA und sfrB Mutanten beeinflußt zu sein.

3.7 Pleiotrope Effekte der sfrB Mutanten auf Flagellenfunktionen

Bei der elektronenoptischen Untersuchung der F-Pili der sfrA und sfrB Mutanten zeigten sich im Fall der sfrB Mutanten erheblich weniger begeißelte Zellen als in der sfr^+ Kontrolle. Um den pleiotropen Effekt der sfrB Mutationen auf

Flagellenfunktionen zu messen, wurden Sensitivitätstests mit dem Phagen χ durchgeführt, dessen Rezeptor nur ein intakter, beweglicher Geißelapparat darstellt (84, 85).

Dieser Test konnte nur mit den sfrB Mutanten durchgeführt werden, da die Parentalstämme der sfrA Mutanten zu schwach begeißelt waren und dadurch wenig χ Phagen adsorbieren.

Zwei Repräsentanten der sfrB Gruppe, sfrB11 und sfrB13 und die dazugehörige sfr^+ Kontrolle wurden im "Spot Test" (2.4.2) auf χ Sensitivität untersucht. Hierbei zeigten beide Mutanten völlige Resistenz, während der sfr^+ Stamm sich als sensitiv erwies. Derivate von sfrB11 und sfrB13, die den komplementierenden F' KL33 tragen (3.3.3) zeigten dagegen χ Sensitivität wie der Kontrollstamm. Somit wurde gezeigt, daß der sfrB Mutationstyp und die Resistenz zu in direktem Zusammenhang stehen.

Die quantitative Untersuchung der Geißelbildung der sfrB Mutanten wurde elektronenoptisch durchgeführt. Hierzu wurden vom sfr^+, sfrB11 und sfrB13 Stamm Präparate hergestellt, die 10 Minuten lang vor der Fixierung mit χ Phagen infiziert wurden, um Bindung der Phagen an die Flagellan zu gewährleisten (85) (2.9.1). Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Tabelle 13 Begeißelung der sfrB Mutanten

	Zahl der Zellen			
Teststamm	unbegeißelt	mit defekten Geißeln	mit intakten Geißeln	% Zellen mit intakt. Geißeln
sfrB11	89	11	0	< 1
sfrB13	81	18	5	4,8
sfr^+	19	14	68	67,3

Als intakte Geißeln wurden nur solche bezeichnet, die χ Phagen am Filament und/oder an der Basalstruktur gebunden hatten. Durch eine hohe Infektionsmultiplizität (MOI = 50) und ausreichender Adsorptionszeit (85) war eine effektive Bindung der Phagen gewährleistet. Der überwiegende Teil der Geißeln, die den Phagen nicht binden konnten, zeigte eine starre abgebrochene Struktur, wohingegen intakte Geißeln eine leicht gewellte Struktur zeigen.

Ein anderer Nachweis für intakte Flagellen ist die Schwimmfähigkeit von Bakterien. Nach der Methode von Armstrong et al. (13)(2.6.6) wurde die Motilität aller sfrA und sfrB Mutanten sowie der sfr^+ Kontrolle getestet. Hierbei zeigten alle sfrB Mutanten mit Ausnahme der "leaky" Mutante sfrB1 eine stark eingeschränkte Motilität auf Schwarmplatten (2.1.2), wohingegen kein Einfluß im Fall der sfrA Mutanten und der sfr^+ Kontrolle festzustellen war. Der flaP Kontrollstamm M1379 (Stammliste) zeigte Resistenz gegen χ und war in seiner Motilität völlig eingeschränkt.

Offenbar zeigen die membranspezifischen sfrB Mutanten einen Einfluß auf die Begeißelung von ihren Wirtsstämmen. Andere pleiotrope Effekte der sfrB Mutanten werden in der Diskussion besprochen.

3.8 Untersuchungen über die Spezifität des sfrA und sfrB Cistrons zur Transkription und Expression der Gene des Flac tra-Operons

3.8.1 Untersuchungen an pRS31 tragenden sfrA und sfrB Mutanten

In 3.5.3 wurde gezeigt, daß im Fall der sfrB Mutanten ein Protein, das wahrscheinlich das traJ Genprodukt darstellt, exprimiert wird. Ferner zeigten alle sechs sfrA und sfrB Mutanten verminderte Synthese von traT Protein. In F^+ Zellen kann das traT Gen nur bei intaktem traJ Genprodukt exprimiert werden, da das tra-Operon unter traJ Kontrolle steht (1, 96). Hierbei ergab sich die Frage, ob das sfrA

bzw. sfrB Genprodukt noch zur TraTp Synthese erforderlich ist, wenn traT nicht mehr der spezifischen Regulation des tra-Operons unterliegt.

Mit Hilfe des clonierten Plasmids pRS31 (89), das neben anderen Genen auch die Gene des tra-Operon codierten Surface Exclusion Systems, traS und traT, trägt (4, 8), war es möglich, die Expression dieser Gene in sfrA und sfrB Mutanten zu untersuchen. Die tra-Gene auf pRS31 werden hierbei nicht mehr vom tra-Operon Promoter aus transkribiert, sondern von einem Promoter des Vektorplasmids pSC101 (26, 55), und die Transkription dieser Gene steht nicht mehr unter der Kontrolle von traJ (55).

Um die Expression der Gene traT und traS auf pRS31 in den sfrA und sfrB F^- Mutanten mit Hilfe des quantitativen Surface Exclusion Tests (2.3.4) zu untersuchen, wurden F^- Derivate der Mutanten sfrA5, sfrA8, sfrB11, sfrB13 und der sfr^+ Kontrollstamm mit pRS31 DNA transformiert (2.6.5). Als Selektion für Extransformation wurde Tetrazyklin Resistenz verwendet, da das Vektorplasmid pSC101 die Gene zur Tet^R trägt und die Rezipientenstämme Tet^S sind. Die pRS31 transformierten Stämme wurden quantitativ auf Surface Exclusion getestet. Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14 Surface Exclusion Indices von pRS31 tragenden sfrA und sfrB Mutanten und des sfr^+ Kontrollstammes

Teststamm	(1) SEI mit pRS31
sfrA5	9475
sfrA8	4174
sfrB11	>13400
sfrB13	13400
sfr^+	5470

Erklärung siehe Text

(1) Mittelwerte aus zwei Versuchen

Aus genetischen und biochemischen Untersuchungen geht hervor, daß das traT Gen auf pRS31 stärker als auf Flac exprimiert wird (4). Daraus ergeben sich höhere Surface Exclusion Indices mit pRS31 als mit Flac. Wie aus Tabelle 14 zu entnehmen ist, hat weder das sfrA noch das sfrB Genprodukt Einfluß auf die Expression des Surface Exclusion Systems von pRS31. Aus den Ergebnissen in 3.5.3 geht hervor, daß möglicherweise das sfrA Genprodukt zur Synthese oder Funktion des traJ Genproduktes erforderlich ist.

Basierend auf dieser Annahme sind die Surface Exclusion Werte der pRS31 tragenden sfrA Mutanten wie erwartet.

Im Fall der sfrB Mutanten kann der Sfx^+ Charakter der pRS31 transformierten Stämme nicht eindeutig einen Transkriptionseffekt zugeschrieben werden, sondern unterliegt, wegen der beobachteten Membranänderung dieser Mutanten, mehreren Deutungen (siehe Diskussion).

4. Diskussion

4.1 Gemeinsame Aspekte der sfrA und sfrB Mutanten

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue, bisher unbekannte Gene von Escherichia Coli K-12, sfrA und sfrB, genetisch untersucht und teilweise ihre Funktion bestimmt. Mutationen in diesen Genen, deren Gewinnung schon in (15) beschrieben wurde, zeigen pleiotrope Effekte auf die Konjugationsfunktionen von Flac und R100 tragenden Stämmen. Hierbei zeigte sich die F-Pilus Bildung, der DNA-Transfer und die Surface-Exclusion Fähigkeit der untersuchten Sex-Faktoren betroffen. In (15) wurden insgesamt zwölf Mutanten zwei genetischen Gruppen zugeordnet. Mit Hilfe des Komplementationstests konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß jede genetische Gruppe ein Cistron darstellt, wobei sechs Mutationen im sfrA und sechs Mutationen im sfrB Cistron lokalisiert sind.

Phänotypisch zeigen alle zwölf sfr Mutationen keinen absoluten Einfluß auf die Konjugationsfunktionen des tra-Operons. So zeigt die Mutante sfrB11, die den ausgeprägtesten Mutationscharakter besitzt, im Vergleich mit einer Amber traJ Mutation (9), einen 2000fach höheren Transferierungswert.

Obwohl die Transferierungs- und Surface Exclusion Funktionen gmeinsam unter der Kontrolle des tra-Operons stehen (45), zeigt sich bei den sfr Mutanten kein paralleler Mutationseinfluß hinsichtlich der Stärke des Effektes auf beide Funktionen. Dies wird beim Vergleich der Mutationen sfrB1 und sfrB11 sowie von sfrA4 und sfrA5 besonders deutlich.

Aus den genetischen Daten geht hervor, daß der sfrA bzw. sfrB Mutationseinfluß alle Funktionen des tra-Operons betrifft, jedoch konnte nicht gezeigt werden, ob wirklich alle Gene des tra Operons direkt betroffen sind. Es ist bekannt, daß traJ Mutanten die Transkription und damit die Expression des Operons beeinflussen (1, 96). Immerhin zeigt das Fehlen von F-Pili bei den Mutanten an, daß der Mutationseffekt nicht erst auf der Ebene des DNA-Transfers,

wie bei traM, traI, traG und traD Mutanten (8, 10), sondern schon beim Aufbau funktionell aktiver F-Pili wirkt, wie es bei traJ und traA-traG Mutanten auch der Fall ist (10, 94, 97).

Mit der in der Arbeit verwendeten Geltechnik ist es jedoch nicht möglich, aus Gesamtmembranen ganzer Zellen alle tra-Proteine, die in der Membran vorhanden sind, darzustellen (55). Nur im Fall von TraTp und möglicherweise TraJp ist der Mutationseinfluß auf der Ebene der Synthese und der Inkorporation des Proteins in der Membran bestimmt worden. Hierbei zeigten alle zwölf sfr Mutanten eine Verminderung von Membrangebundenen TrTp, was mit dem Mutationseinfluß auf die Surface Exclusion Funktion übereinstimmt.

Alle sfrA und sfrB Mutationen zeigten Rezessivität gegenüber dem entsprechenden Wildtypallel. Es erscheint daher hoch wahrscheinlich, daß beide Genprodukte Proteine darstellen, deren Funktion vom Wildtypprodukt ersetzt werden kann. Darüber hinaus ist es durchaus möglich, daß noch mehr unbekannte Gene auf dem E. Coli K-12 Chromosom existieren, die die Donatorfunktion im Konjugationsprozeß beeinflussen und möglicherweise mit sfrA bzw. sfrB im funktionellen Zusammenhang stehen. Die bisher beschriebenen Wirtsfaktoren, die die Konjugation beeinflussen, sind genetisch verschieden von den in dieser Arbeit behandelten Mutanten (Tabelle 15). Es geht jedoch aus den bisher erfolgten Untersuchungen hervor, daß eine Vielfalt von Faktoren der Zelle entscheidend für den Konjugationsprozeß sind (6, 23, 81, 82, 83).

Da im Verlauf der Arbeit sich unterschiedliche Spezifitäten des sfrA und sfrB Cistrons herausstellten, sollen diese im folgenden Teil getrennt voneinander diskutiert werden:

4.2 Aspekte der sfrA Mutanten

Die Spezifität der Wirkung des sfrA Cistrons wird bei der Betrachtung der Abhängigkeit der Konjugationssysteme verschiedener Sex-Faktoren von dessen Genprodukt deutlich.

Hierbei zeigte sich, daß offenbar nur F-ähnliche Sex-Faktoren (71), mit der Ausnahme von R1-19, dem sfrA Einfluß unterliegen (Ergebnisse 3.4). Die Gemeinsamkeiten der F-ähnlichen Sex-Faktoren begründen sich auf Sensitivität gegen F-Pilus spezifische Bakteriophagen, serologischen Gemeinsamkeiten der F-Pili, Sequenzhomologien in Teilen der DNA der tra-Gene und auf Komplementationsanalysen (5, 29, 71). Soweit sollte sich die Homologie unter den F-ähnlichen Sex-Faktoren auch auf die Wirkung(sstelle) des sfrA Genprodukts direkt oder indirekt erstrecken. R1-19 müßte demnach eine sfrA unabhängige Variante unter den F-ähnlichen Sex-Faktoren darstellen.

Ebenso zeigten sich die Transferierungsfunktionen einer großen Zahl verschiedener Sex-Faktoren (3.4) sfrA unabhängig, was einen Hinweis auf unterschiedliche Konjugationssysteme, die Plasmid-abhängig sind, darstellt.

Ein chromosomaler Analog zum in der Einleitung beschriebenen FinOP System, das Repressorfunktion auf das tra-Operon zeigen würde, erscheint hier unwahrscheinlich, da die sfrA Mutanten rezessiv sind. Ein solcher, durch Mutation entstandener chromosomaler Repressor sollte aber im Komplementationsfall gegenüber dem Wildtypallel Dominanz zeigen, da seine Funktion nicht aufgehoben wird.

Bei der Diskussion über den direkten oder indirekten Charakter der Wirkung der sfrA Mutationen spielen Membranuntersuchungen eine wichtige Rolle. Hierbei könnte, hervorgerufen durch eine Membranänderung, der Aufbau aktiver F-Pili inhibiert werden. Aufgrund der Untersuchungen zur Bakteriophagensensitivität (3.6.1), die Hinweise auf Membranveränderungen geben kann (39, 61, 78, 93), fanden sich keine vom Wildtyp abweichende Eigenschaften der sfrA Mutanten. Auch in gelelektrophoretischen Untersuchungen wurde kein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster gefunden, daß auf eine Membranänderung hinweist (3.7.1). Dazu zeigten die sfrA Mutanten im Antibiotikasensitivitätstest keine Änderung zur sfr^+ Kontrolle. Ein verändertes Sensitivitätsmuster kann ebenfalls auf Membranänderungen hindeuten (39,

sfrB Mut.). Zusammengefaßt liegen bisher keine Hinweise auf eine indirekte Beeinflussung der Konjugation im Fall einer sfrA Mutation vor.

Anhand der gelelektrophoretischen Untersuchung der Membranproteine der sfrA Mutanten zeigte sich die Synthese bzw. Inkorporation des traT Proteins beeinflußt, jedoch nicht völlig unterbunden. Der Mutationseffekt auf traT ist korreliert mit den niedrigen Surface-Exclusion Indices der sfrA Mutanten, da es auch bekannt ist, daß traT Mutanten selbst einen niedrigen SEI zeigen (4). Inwieweit das andere Surface Exclusion Gen traS beeinflußt ist, konnte genetisch und biochemisch nicht untersucht werden.

Die Ergebnisse 3.5.3 deuten außerdem auf einen starken Mutationseffekt auf Bildung oder Funktion des traJ Genproduktes. In diesem Fall kann die niedrige Rate an TraTp durch den Mutationsfluß auf traJ erklärt werden (1, 96). Dies zeigt auch Übereinstimmung mit den Ergebnissen 3.8.1, wo bei traJ unabhängiger Expression der Surface Exclusion Gene traT und traS das Surface Exclusion Eigenschaft der sfrA Mutanten wieder voll hergestellt wird. Auch das Fehlen von F-Pili in Flac$^+$, sfrA Mutanten deutet auf einen die TraJp Synthese oder Funktion beeinflussenden Mutationseffekt hin, da dieses Protein neben seiner Funktion als positives Kontrollgenprodukt auch die Vorstufe des F-Pilus darstellt (R. Helmuth, pers. Mitteilung).

Aus den Untersuchungen von Riva et al. (81), Romero et al. (82) und Sabourin und Beckwith (83) zeigte sich, daß die Transkription der tra und pif-Gene einem speziellen Mechanismus unterliegt. Hierbei erkannte man, daß eine veränderte Untereinheit der RNA Polymerase selektiv die Transkription der tra und pif Gene von F$^+$ Zellen verhindert. Es ist bekannt, daß die Untereinheit der RNA Polymerase wichtige Bindungsfunktionen des Enzyms bestimmt (51). Bei der von Romero et al. (82) isolierten Rif^r Mutante scheint die Bindungsfähigkeit an Promotoren der tra und pif Gene durch die Mutation verlorengegangen zu sein. Promotoren, die zur Transkription ihrer anfolgenden Gene eine modifizierte RNA-

Polyermase benötigen, sind zum Beispiel am Phagen T7 beschrieben worden (24). Rattner (79) konnte biochemisch unterschiedliche Wirtsproteine nachweisen, die am Core-Komplex der RNA Polymerase binden und möglicherweise zur Promotorselektivität erforderlich sind.

Aufgrund dieser Untersuchungen besteht die Möglichkeit, daß das sfrA Genprodukt einen solchen Wirtsfaktor darstellt, der zumindest zur effizienten Transkription des traJ Gens erforderlich ist. Klärend wäre hierzu eine Untersuchung, ob im Fall der sfrA Mutanten die Transkription oder Translation von traJ bzw. des tra-Operons betroffen ist.

Mutationen mit Einfluß auf die Translation des tra-Operons und der pif Gene sind von Chakrabarti und Gorini (23) im Bereich der ribosomalen Gene untersucht worden. Aufgrund der genetischen Kartierung sind diese Mutanten von den sfrA und sfrB Mutanten unterscheidbar. In der Nachbarschaft des sfrA Cistrons sind andere, die Plasmid-Replikation betreffende (40, 53) Mutanten isoliert worden, welche sich phänotypisch von den sfrA Mutanten unterscheiden. Darüber hinaus sind Mutanten mit sfrA Phänotypen in der Nachbarschaft des thr Locus isoliert worden (88). Diese wurden jedoch nicht weit genug genetisch und biochemisch untersucht, um die Identität mit den sfrA Mutanten zu bestätigen.

4.3 Aspekte der sfrB Mutanten

Obwohl alle sechs isolierten Mutanten der SfrB Gruppe in einem Cistron, sfrB, mutiert sind, zeigen sich unterschiedliche Phänotypen dieser Mutanten. Hierbei fällt auf, daß die F spezifische ØII Restriktion im Fall der Mutanten sfrB3 und sfrB11 fast völlig aufgehoben ist, wohingegen die übrigen vier sfrB Mutanten keinen Einfluß auf diese Funktion zeigen. Ein Effekt, daß Mutationen innerhalb eines Cistrons unterschiedliche Phänotypen hervorbringen, ist auch bei ompA Mutanten (70) beschrieben worden.

Die Rezessivität der sfrB Mutationen gegenüber dem Wildtyp-

allel sfr$^+$ und das Hervorbringen unterschiedlicher Phänotypen innerhalb des gleichen Cistrons zeigen an, daß das sfrB Genprodukt ein Protein darstellt.

Auch für das sfrB Genprodukt ist eine Spezifität der Abhängigkeit von F-ähnlichen Sex-Faktor Konjugationssystemen, mit Ausnahme von ColV2, festzustellen. Darüber hinaus sind je zwei verschiedene Plasmide der Incompatibilitätsgruppen C und S sfrB abhängig. Dies ist insofern überraschend, da Plasmide dieser Incompatibilitätsgruppen keine bekannten Gemeinsamkeiten mit F-ähnlichen Sex-Faktoren haben (29, 44, Y.A. Chabbert, pers. Mitt.). Aufgrund der bekannten Homologien der F-ähnlichen Sex-Faktoren, die in 4.2 beschrieben wurden, ist daher die Spezifität der Wirkung des sfrB Genproduktes nicht zu erklären. Zwischen Sex-Faktoren der Gruppen A und C wurden Gemeinsamkeiten gefunden (29), jedoch zeigte sich RA1 als Repräsentant der Incompatibilitätsgruppe A als sfrB unbeeinflußt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das sfrB Genprodukt funktionell nicht direkt auf die Expression des tra-Operons wirkt, sondern als Wirtsfaktor indirekt bei der Konjugation der untersuchten Plasmide eine Rolle spielt.

Weitere Hinweise auf eine möglicherweise indirekte Beeinflussung der Konjugation durch das sfrB Genprodukt ergaben sich aus Membranuntersuchungen. Hierbei zeigten die Phagentests, gelelektrophoretischen Membranuntersuchungen und Antibiotikasensitivitätstests zahlreiche Ergebnisse, die auf einen Membrandefekt der sfrB Mutanten hinwiesen.

Die Ergebnisse der Phagentests mit C21 und U3 deuten auf eine veränderte LPS Struktur der sfrB Mutanten. Der Zusammenhang zwischen bestimmten LPS Veränderungen und dem C21/U3 Sensitivitätsmuster bei E. Coli K-12 ist bekannt (54, 78, 93). So werden K-12 Stämme, die bestimmte gal$^-$ Mutationen tragen, U3 resistent, da keine Galactose in die LPS Schicht eingebaut wird (93) und daher der Rezeptor dieses Phagen verlorengeht. Gleichzeitig werden diese Stämme, durch die LPS Änderung bewirkt, C21 sensitiv. Hancock

und Reeves (39) isolierten $U3^r$ $C21^s$ E. Coli K-12 LPS Mutanten, die eine höhere Empfindlichkeit als der Wildtyp gegenüber Novobiocin zeigten. Die Funktion dieser Mutanten als Donatoren wurde nicht beschrieben, und eine genetische Kartierung ist nicht erfolgt. Obwohl die beschriebenen Phänotypen dieser Mutanten denen der sfrB Mutanten gleichen, bleibt daher die Frage nach der Identität dieser Mutanten offen.

Aufgrund der genetischen Kartierung der gal$^-$ Mutationen, die U3 Resistenz bei E. Coli K-12 hervorrufen, können solche Mutanten vom sfrB Cistron unterschieden werden. Auch Fgal tragende sfrB Derivate, die unter Galactosesupplementierung wuchsen, zeigten weiterhin U3 Resistenz. Daher erscheint es naheliegend, daß die sfrB Mutation eine LPS Veränderung bewirkt, die der von gal$^-$ Stämmen gleichkommt. Auch das veränderte Sensitivitätsmuster zum Phagen T3, dessen Rezeptor ebenfalls die LPS Schicht darstellt (39), würde diese Vermutung erhärten.

Andere Hinweise auf Membranveränderungen bei den sfrB Mutanten ergeben sich durch gelelektrophoretische Untersuchungen der Membranproteine. Neben dem fehlenden Protein X zeigen die sfrB Membranproben Veränderungen im Bandenmuster des unteren Gelbereichs (Abbildung 1 und 2). Da diese Veränderungen auch in F$^-$ Proben auftreten, handelt es sich um chromosomal codierte Proteine. Nicht geklärt ist, ob der Effekt einer sfrB Mutation über die Membran auf die Funktion der Konjugation wirkt, oder ob durch diese Mutationen sowohl die Membranstruktur, als auch Sex-Faktor Funktionen beeinflußt werden. Jedoch bestehen dafür aus dieser Arbeit keine Hinweise.

Sollte das sfrB Genprodukt nur für die Membran des Wirtes erforderlich sein und indirekt die Konjugation beeinflussen, wäre die geringere Menge an TraTp in der Membran der sfrB Mutanten nicht auf der Ebene der Synthese dieses Proteins, sondern aufgrund einer schlechteren Inkorporation in die defekte Membran zu erklären. Hierfür spricht auch der Befund, daß möglicherweise die TraJp Synthese in den sfrB

Mutanten nicht merklich inhibiert ist.

Die pRS31 transformierten sfrB Stämme zeigen eine Wiederherstellung der Surface Exclusion Fähigkeit. Hinsichtlich der Theorie, daß der sfrB Mutationseffekt nicht direkt die Expression des tra-Operons beeinflußt, kann dieser Effekt durch Überproduktion von TraTp bei pRS31 tragenden Zellen und daraus folgender Kompensation des schlechteren Einbaus dieses Proteins durch dessen Menge erklärt werden.

Hinweise auf veränderte Membranstrukturen, die einen Einfluß auf das Konjugationsverhalten zeigen, sind im Rezipienten anhand der zahlreichen Con$^-$ Mutanten bekannt (siehe Einleitung). Auch die Donatorfunktion kann durch Membrandefekte gestört werden (P. Silverman, pers. Mitt.). Hierbei liegt bei den sfrA und sfrB Mutanten offensichtlich kein signifikanter Con$^-$ Phänotyp vor, da diese Stämme sich als normale Rezipienten in Konjugationsexperimente zeigen. Auch genetisch sind die bisher isolierten Con$^-$ Mutanten von den sfr$^-$ Mutanten zu unterscheiden.

Ein verändertes Bakteriophagensensitivitätsmuster und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika scheint als pleiotroper Effekt mutationsbedingt veränderter Membranen aufzutreten (42, 43, 80, 87, diese Arbeit). Hinsichtlich des Einflusses auf die Konjugation jedoch scheinen solche Membranänderungen stark spezifische Effekte zu zeigen. Dies zeigt sich an vergleichenden Untersuchungen an Con$^-$ Mutanten (6), die analog wie die sfrB Mutanten nur bestimmte Klassen von Sex-Faktoren betreffen. Möglicherweise wäre eine generell auf Konjugation wirkende Mutante lethal, da zuviel verschiedene Membrandefekte auftreten müßten, um diese zu erzielen.

Unter den Con$^-$ Mutanten fanden sich Klassen, die den Aufbau funktionell aktiver Flagellen betreffen (42, 80). Auch die sfrB Mutanten zeigen einen starken Effekt auf die Geißelbildung und die F-Pilus Bildung. Nach Untersuchungen von DePamphilis und Adler (31) ist die LPS Schicht mit an der Verankerung des Flagellums in der Zellwand beteiligt. Mög-

licherweise kann das sfrB Genprodukt einen Faktor zum Filamentaufbau (Geißeln, Pilus), der in der Membran vorhanden ist, darstellen. Jedoch ist zu bemerken, daß die bakteriellen Fimbrien, die ebenfalls Filamentstruktur haben, von den sfrB oder sfrA Mutanten nicht betroffen sind.

Andere pleiotrope Effekte der sfrB Mutanten stellen eine erhöhte Transformierbarkeit dieser Stämme und schlechteres Wachstum im Vergleich mit dem Wildtyp dar. Diese Effekte sind jedoch nicht spezifisch genug, um Aufschluß über den weiteren Charakter der sfrB Mutanten zu geben. So könnte die erhöhte Transformierbarkeit einerseits auf einer für die DNA durchlässigeren Membran beruhen, andererseits aber auch in veränderter Nukleaseaktivität der Zelle selbst. Es besteht jedoch aufgrund der bisher über die sfrB Mutanten gewonnenen Daten eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß diese Stämme Membrandefekt sind. Darüber hinaus lassen die Eigenschaften dieser Mutanten auf einen indirekten Einfluß des sfrB Genproduktes auf die abhängigen Konjugationssysteme schließen.

4.4 Ausblick

Die Entdeckung der Konjugation bei Bakterien durch Lederberg und Tatum (58) 1946 führte zu intensiven Untersuchungen über den Mechanismus und die Genetik der Konjugation am F-Faktor selbst. Nachdem viele Plasmid-spezifische Genfunktionen und Mechanismen bekannt waren, traten auch chromosomal codierte Wirtsfaktorn, die auf Plasmidfunktionen Einfluß nehmen, mehr in den Vordergrund des Interesses. Sicherlich hängt auch das Verständnis der Funktion dieser Wirtsfaktoren sehr von der bisherigen Kenntnis der Plasmide ab.

Ein zentraler Punkt zum Verständnis der Rolle des Wirtes in der Konjugation stellt die bakterielle Zellwand dar, deren Beschaffenheit für den Rezipienten und für den Donatoren notwendige Kriterien erfüllen muß. Aus den Untersuchungen an Con^- Mutanten geht hervor, daß verschiedene

Konjugationssysteme sich bestimmter Faktoren der Membran bedienen müssen, um den DNA Transfer zu ermöglichen. Die notwendigen Bedingungen der bakteriellen Membran für den Donator im Konjugationsprozeß, die wiederum je nach Plasmid verschieden zu sein scheinen, sind noch verhältnismäßig unverstanden.

Aus dieser Arbeit läßt sich jedoch schließen, daß wie bei Con$^-$ Mutanten ähnliche spezifische Membranfaktoren für verschiedene Konjugationssysteme existieren müssen. Im Fall der sfrB Mutanten müssen daher noch intensivere Membranuntersuchungen erfolgen, insbesondere an der LPS Schicht (Chromatographie), um den Mutationseinfluß besser definieren zu können. Ferner muß noch die Frage geklärt werden, ob das sfrB Genprodukt direkt oder indirekt auf das Transferierungssystem der betroffenen Sex-Faktoren wirkt. Ein direkter Einfluß der sfrA und sfrB Mutanten auf die Transkription der F tra-Gene könnte mit tra-Operon spezifischer DNA/RNA Hybridisierung durchgeführt werden. Hierbei würde geklärt werden, ob in den sfr$^-$ Mutanten eine mRNA der tra Gene synthetisiert wird.

Darüber hinaus bleibt die Frage, inwieweit die Translation der tra-Gene in den sfrA und sfrB Mutanten betroffen ist; bzw. der Transport oder die Inkorporation dieser Proteine in der bakteriellen Membran. Hierzu wären zwei-dimensionale Gelelektrophoresen zur Untersuchung von Vorteil, da wegen der besseren Auflösung der Proteine in diesem System einige tra Proteine trotz ihrer Minorität identifiziert werden könnten. Bei der getrennten Untersuchung des Cytoplasmas und der Membran mit solchen Gelen könnte auch die Frage des Einflusses auf Synthese und Transport der Proteine geklärt werden.

Bei den sfrA Mutanten ist es erforderlich, den Effekt der Mutation auf die Synthese oder Inkorporation von TraJp in der Membran zu beweisen. Hierzu sind vergleichende Gelanalysen mit Membranproben von Flac und Flac, traJ$^-$ Stämmen notwendig, um das in dieser Arbeit als TraJp bezeichnete Protein als solches zu bestätigen.

Sollte, wie in dieser Arbeit vermutet, das sfrA Genprodukt notwendig für die Expression von traJ sein, erhält die Regulation des DNA Transfers zusätzliche neue Aspekte. Möglicherweise stellt dieses Genprodukt eine chromosomale positive Kontrolle der Konjugationsfunktion selbst dar, die ihrerseits wiederum einem anderen Regulationsmechanismus unterliegen sollte. Allgemein ergeben sich daraus zahlreiche neue Aspekte der Regulation der Konjugation verschiedener Sex-Faktoren, die durch die Wirtszelle selbst stattfindet. Dies sollte sowohl für Doantoren als auch für Rezipienten der Fall sein.

Leider führen in vitro Transkriptions- und Translationsuntersuchungen in dieser Frage nicht weiter, da bekannt ist, daß in in vitro und in Minizellsystemen eine traJ unabhängige Synthese der tra-Proteine erfolgt (55). In vivo Untersuchungen sind daher weiterhin zur Klärung der Regulationsmechanismen des DNA-Transfers notwendig, obwohl sich bei der Durchführung und Auswertung wesentlich größere Schwierigkeiten ergeben.

Tabelle 15 Aufstellung der bekannten chromosomalen Faktoren zur Funktion des Donators im Konjugationsprozeß

Mutation	genetische Kartierung	Phänotyp	vermutete Wirkung	Verfasser
crp	73'	Tra^- (F)	Transkription des F tra-Operons	Sabourin + Beckwith (83)
rpoB	89'	Tra^- (F), resistent gegen F-Pilus spez. Phagen, Einfluß auf pif Gene	ß-Untereinheit der RNA-Polymerase, Promotorspezifität für tra und pif Gene	Riva et al. (81) Romero et al.(82)
rpsL	72'	Tra^- (F), Einfluß auf pif Gene, Sfx^+	Translation der tra- und pif Gene	Chakrabarti + Gorini (23)
cpxA cpxB cpxC cpxD	87' ? 98'-10' ?	Tra^- (F+I), resistent gegen F-Pilus spez. Phagen, Membran defekt	Membran	P. Silverman (pers. Mitteilung)
sfrA	0/100'	F Tra^-, Sfx^-, resistent gegen F-Pilus spez.Phagen	Transkriptionskontrolle des F tra-Operons	diese Arbeit
sfrB	85'	F Tra^-, Sfx^-, resistent gegen F-Pilus spez.Phagen, Fla^-, $U3^r$, $C21^s$ Membrandefekt	Membran	diese Arbeit

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden zwei neue, bisher unbekannte Gene von Escherichia Coli K-12 dargestellt, deren Mutation pleiotrope Effekte auf das Konjugationsverhalten von Donatorstämmen bei bestimmten Sex-Faktoren bedingt.

Diese Mutanten werden als sfr (sex-factor-regulation)s Mutanten bezeichnet. Ein Gen, sfrA, wird durch sechs unabhängige rezessive Mutationen repräsentiert und konnte genetisch in der engen Nachbarschaft der thr Gene (0'/100') kartiert werden. Die andere Gruppe von ebenfalls sechs rezessiven Mutanten repräsentiert das Gen sfrB, das bei 85' auf der E. Coli Chromosomenkarte (14) genetisch kartiert wurde.

Beide Typen von Mutanten, sfrA und sfrB, zeigen Spezifität der Wirkung auf je eine Gruppe von transferierbaren Plasmiden, wobei F-ähnliche Sex-Faktoren sowohl sfrA als auch sfrB abhängig sind.

Die Gruppe der sfrA Mutanten zeigt offenbar einen Einfluß auf die Bildung des F traJ Genproduktes, das eine positive Kontrolle zur Transkription des F tra-Operons darstellt.

Die Gruppe der sfrB Mutanten zeigt pleiotrope Membrandefekte, die möglicherweise auch die Konjugationsfunktion von sfrB Donatorstämmen mit beeinflussen.

6. Literatur

1) Achtman, M.: Transfer positive J-independent Revertants of the F Factor in Escherichia coli K-12. Gent. Res. Cambrdige 21,67-77.

2) Achtman, M.: Mating aggregates in Escherichia coli conjugation. J. Bact. 123, 505-515 (1975).

3) Achtman, & Helmuth, R.: The F Factor carries an Operon of more than 15×10^6 Daltons coding for Deoxyribonucleic Acid Transfer and Surface Exclusion. Microbiology - 74, D. Schlessinger, A.S.M. Publications, Washington USA (1974).

4) Achtman, M. Kennedy, N. & Skurray, R.: Cell-cell interactions in conjugating Escherichia coli: Role of traT protein in surface-exclusion. Proc. Nat. Acad. Science 74, 5104-5108 (1977).

5) Achtman, M., Kusecek, B. & Timmis, K.N.: tra Cistrons and Proteins Encoded by the Escherichia coli Antibiotic Resistance Plasmid R6-5. Molec. Gen. Genet. 163, 169-179 (1978).

6) Achtman, M., Schwuchow, S., Helmuth, R., Morelli, G. & Manning, P. A.: Cell-cell Interactions in Conjugating Escherichia coli: Con^- Mutants and Stabilization of Mating Aggregates. Molec. Gen. Genetics 164, 171-183 (1978).

7) Achtman, M. & Skurray, R.: A Redifinition of the Mating Phenomenon in Bacteria Microbial Interactions, pp.233-279, Chapman & Hall, London.

8) Achtman, M., Skurray, R., Thompson, R., Helmuth, R., Hall, S., Beutin, L. & Clark, A.: Assignment of tra Cistrons to EcoR1 Fragments of F sex Factor DNA. J.Bacteriology 133,1383-1392(1978).

9) Achtman, M., Willetts, N. & Clark, A.: Beginning a Genetic Analysis of Conjugational Transfer Determined by the F Factor in Escherichia coli by Isolation and Characterization of Transfer-Deficient Mutants. Journal of Bacteriology, Vol. 106, 529-538 (1971).

10) Achtman, M., Willetts, N. & Clark, A.: Conjugational Complementation Analysis of Transfer-Deficient Mutants of Flac in Escherichia coli. J. Bact. 110, 831-842 (1972).

11) Adams, M.H.: Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York, USA (1959).

12) Anthony, W.M., Deonier, R.C., Lee, H., Hu, S. & Ohtsubo, E.: Electron Microscope Heteroduplex Studies of Sequence Relations Among Plasmids of E. Coli. Note on the Deletion Mutant of F, F_{Δ} (33-43). J. Molec. Biol. 89, 647-650 (1974).

13) Armstrong, J.B., Adler, J. & Dahl, M.M.: Nonchemotactic Mutants of Escherichia coli. J. Bact. 93, 390-398 (1967).

14) Bachmann, B., Brooks Low, K. & Taylor, A.L.: Recalibrated Linkage Map of Escherichia coli K-12. Bacteriological Reviews 40, 116-167 (1976).

15) Beutin, L.: Genetische Untersuchungen an chromosomalen Mutanten von E. Coli K-12, die Sex Faktor Funktionen beeinflussen. Diplomarbeit am FB 23 der FU Berlin (1976).

16) Brickman, E., Soll, L. & Beckwith, J.: Genetic Characterization of Mutations Which Affect Catabolite-Sensitive Operons in Escherichia coli, Including Deletions of the Gene for Adenyl Cyclase. J. Bact. 116, 582-587 (1973).

17) Brinton, C.D.: Non-Flagellar Appendages of Bacteria. Nature 183, 782-786 (1959).

18) Brinton, C.C.: The properties of sex-pili, the viral nature of the "conjugal" genetic transfer systems, and some possible approaches to the control of bacterial drug resistance. Crit. Rev. Microbiol. 1, 105-160 (1971).

19) Boman, H.G. & Monner, D.A.: Characterization of Lipopolysaccharides from Escherichia coli K-12 Mutants. J. Bacteriology 121, 455-464 (1975).

20) Caro, L.G. & Schnös, M.: The attachment of male-specific bacteriophage f1 to sensitive strains of Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 126-132 (1966).

21) Cavalli, L.L.: La sessualita nei batteri. Boll. Ist Sieroterap Milano 29, 281-289 (1950).

22) Cavalli, L.L., Lederberg, J. & Lederberg, E.M.: An infective factor controlling sex compatibility in Bacterium coli. J. Gen. Microbiol. 8, 89-103 (1953).

23) Chakrabarti, S. & Gorini, L.: Growth of Bacteriophage MS2 and T7 on Streptomycin-Resistant Mutants of Escherichia coli. J. Bact. 121, 670-674 (1975).

24) Chamberlin, M.J.: RNA Polymerase, Cold Spring Harbor Laboratory (1976) USA.

25) Cohen, S., Chang., C. & Hsu, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli K-12 by R-Factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2110-2114 (1972).

26) Cohen, S.N., Chang., A.C.Y., Boyer, H.W. & Helling, R.B.: Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3240-3244 (1973).

27) Crawford, E.M. & Gesteland, R.F.: The adsorption of bacteriophage R17. Virology 22, 165-167 (1964).

28) Cuzin, R. & Jacob, F.: Mutations de l'épisome F d'Escherichia Coli K-12 Mutants a réplications thermosensible. Annal. de l'Institut Pasteur 112, 4, 397-418 (1967).

29) Datta, N.: Epidemiology and Classfication of Plasmids. Microbiology - 1974, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

30) Davidson, N., Deonier, R., Hu, S. & Ohtsubo, E.: Electron Microscope Heteroduplex Studies of Sequence Relations Among Plasmids of Escherichia coli. X. Deoxyribonucleic Acid Sequence Organization of F- and F-Primes, and the Sequences Involved in Hfr Formation. Microbiology 1, 56-66 (1974).

31) DePamphilis, M.L. & Adler, J.: Attachment of Flagellar Basal Bodies to the Cell Envelope: Specific Attachment to the Outer, Lipopolysaccharide Membrane and the Cytoplasmic Membrane. J. Bact. 105, 396-407 (1971).

32) Fan, D.: Deletions in limited homology recombination in Escherichia coli. Genetics 61, 351 (1969).

33) Falkinham, J.O. & Curtiss, R.: Isolation and Characterization of Conjugation Deficient Mutants of Escherichia coli K-12. J. Bact. 126, 1194-1206 (1976).

34) Finnegan, D.J. & Willetts, N.: Two classes of Flac mutants insensitive to transfer inhibition by an F-like R factor. Molec. Gen. Genet. 111, 256-264 (1971).

35) Finnegan, D. & Willetts, N.: The Nature of the Transfer Inhibitor of Several F-like Plasmids. Molec. Gen. Genetics 119, 57-66 (1972).

36) Finnegan, D.J. & Willetts,N.: The site of action of the F-transfer inhibitor. Molec. Gen. Genet. 127, 307-316 (1973).

37) Gasson, M.J. & Willetts, N.: Five Control Systems Preventing Transfer of an Escherichia coli K-12 sex Factor F. J. Bact. 122, 518-525 (1975).

38) Gratia, A.: Sur un remarquable example d'antigonisme entre deux souches de colibacille. C.R. Soc. Biol. 93, 1040-1041 (1925).

39) Hancock, R.E.W. & Reeves, P.: Lipopolysaccharide-Deficient, Bacteriophage-Resistant Mutants of Escherichia coli K-12. J. of Bacteriology 127, 98-108 (1976).

40) Hathaway, B.G. & Bergquist, P.L.: Temperature Sensitive Mutations Affecting the Replication of F-prime Factors in Escherichia coli K-12. Molec. Gen. Genetics 127, 297-306 (1973).

41) Havekes, L.M. & Hoekstra, W.: Characterization of an Escherichia coli K-12 F^- Con^- Mutant. J. Bact. 126, 593-600 (1976).

42) Havekes, L.M., Lugtenberg, B. & Hoekstra, W.: Conjugation Deficient E. coli K-12 F^- Mutants with Heptose-less Lipopolysaccharide. Molec. Gen. Genet. 146, 43-50 (1976).

43) Havekes, L., Tommassen, J., Hoekstra, W. & Lugtenberg, B.: Isolation and Characterization of Escherichia coli K-12 F^- Mutants Defective in Conjugation with an I-Type Donor. J. Bact. 129, 1-8 (1977).

44) Hedges, R.W., Rodriguez-Lemoine, V. & Datta, N.: R Factors from Serratia marcescens. J. of General Microbiol. 86, 88-92 (1975).

45) Helmuth, R. & Achtman, M.: Operon structure of DNA transfer cistrons on the F sex factor. Nature, Vol. 257, Nr. 5528, 652-656 (1975).

46) Helmuth, R. & Achtman, M.: Cell-cell interactions in conjugating Eschrichia coli: Purification of F pili with biological activity. Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 1237-1241 (1978).

47) Hirota, Y. & Snetah, P.: F' and F mediated transduction in Escherichia coli K-12. Jap. J. Genetics 36, 307-318 (1961).

48) Hoar, D.I.: Fertility Regulation in F like Resistance Transfer Factors. Journal of Bacteriology 101, 916-920 (1970).

49) Hubacek, J. & Brana, H.: The Maintenance Affinities of KLF-1 Proximal F Merogenotes in Escherichia coli. Molec. Gen. Genetics 144, 217-221 (1976).

50) Ippen-Ihler, K., Achtman, M. & Willetts, N.: A deletion map of the E. Coli sex-factor F: the order of eleven transfer cistrons. J. Bact. 110, 857-863 (1972).

51) Ishihana, A. & Ito, K.: Subunits of RNA-Polymerase in Function and Structure. J. Molec. Biol. 72, 111-123 (1972).

52) Jacob, F., Brenner, S. & Cuzin, F.: On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 28, 329-343 (1963).

53) Jamieson, A.F. & Bergquist, P.L.: Genetic Mapping of Chromosomal Mutations Affecting the Replication of the F Factor of Escherichia coli. Molec. Gen. Genetics 148, 221-223 (1976).

54) Kalckar, H.M., Laursen, P. & Rapin, A.M.: Inactivation of Phage C21 by Various Preparations from Lipopolysaccharide of E. coli K-12. Roc. of Nat. Acad. of Science 56, 1852-1858 (1966).

55) Kennedy, N., Beutin, L., Achtman, M., Skurray, R. Rahmsdorf, U. & Herrlich, P.: Conjugation Proteins encoded by the F sex factor. Nature 270, 580-585 (1977).

56) Kingsbury, D.T. & Helinski, D.R.: Temperature-sensitive Mutants for the Replication of Plasmids in Escherichia coli I-Isolation and Specificity of Host and Plasmid Mutations. Genetics 74, 17-31 (1973).

57) Lederberg, J.: Gene Recombination and linked Seggregation in Escherichia coli. Genetics 32, 505-525 (1947).

58) Lederberg, J. & Tatum, E.L.: Novel genotype in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 113-114 (1946).

59) Lederberg, J., Cavalli, L. & Lederberg, E.M.: Sex Compatibility in Escherichia coli. Genetics 37, 720-730 (1952).

60) Lennox, E.S.: Transduction of Linked Genetic Characters of the Host by Bacteriophage P1. Virology 1, 190-206 (1955).

61) Lindberg, A.A.: Bacteriophage Receptors. Ann. Review Microbiology 27, 205-241 (1973).

62) Lomax, M.S. & Greenberg, G.R.: Characteristics of the deo-Operon: Role in Thymine Utilization and Sensitivity to Deoxyribonucleosides. J. Bact. 96, 501-514 (1968).

63) Low, B.: Formation of Merodiploids in Matings with a Class of rec⁻ Recipients Strains of Escherichia coli K-12. Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 160-167 (1968).

64) Low, B. & Wood, T.: A quick and efficient method for interruption of bacterial conjugation. Genet. Res. Cambridge 6, 300-303 (1965).

65) Lovett, M.A., Helinski, D.R.: Method for the Isolation of the Replication Region of a bacterial Replicon: Construction of a Mini F'km Plasmid. J. Bact. 127, 982-987 (1976).

66) Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., von der Hoek, P. & van Alphen, L.: Electrophoretic Resolution of the Major Outer Membrane Protein of Escherichia coli K-12 into four Bands. FEBS Letters 58, 254-258 (1975).

67) Luria, J. & Burrous, : Hybridization between E. coli and shigella. J. Bact. 74, 461-476 (1957).

68) Maccacaro, G.A. & Hayes, W.: Pairing Interaction as the Basis for negative Interference. Genet. Res. Cambridge, 406-413 (1961).

69) Manning, P. & Reeves, P.: Recipient Ability of Bacteriophage-Resistant Mutants of Escherichia coli K-12. J. Bact. 124, 576-577 (1975).

70) Manning, P. & Reeves, P.: Outer Membrane of Escherichia coli K-12: Differentiation of Proteins 3A and 3B on Acrylamide Gels and Further Characterization of con (tolC) Mutants. J. Bact. 127, 1070-1079 (1976).

71) Meynell, E., Meynell, G.G. & Datta, N.: Phylogenetic Relationships of Drug-Resistance Factors and Other Transmissible Bacterial Plasmids. Bacteriological Reviews 32, 55-83 (1968).

72) Monner, D.A., Boman, H.G. & Johnson, S.: Ampicillin resistant mutants of Escherichia coli K-12 with lipopolysaccharide alterations affecting mating ability and susceptibility to sex specific bacteriophages. J. Bact. 107, 420-432 (1971).

73) Monod, J., Cohen, Bazaire, Cohn, M.: Sur la biosynthèse de ß-Galactosidase (Lactase) chez E. coli. La spécifité de l'induction. Biochem. Biophys. Acta 7, 585-599 (1951).

74) Novick, R.P.: Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bacteriol. Reviews 33, 210-263 (1969).

75) Novick, R.P., Clowes, R.C. Cohen, S.N., Curtiss, R., Datta, N. & Falkow, S.: Uniform Nomenclature for Bacterial Plasmids: a Proposal. Bacteriological Reviews 40, 168-189 (1976).

76) Okada, T., Yanagisawa, K. & Ryan, F.J.: A Method for Securing Thymineless Mutants from Strains of E. Coli. Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 403-412 (1961).

77) Ponta, H., Rahmsdorf, H., Pai, D., Hirsch-Kauffmann, M., Herrlich, P. & Schweiger, M.: Control of Gene Expression in Bacteriophage T7: Transcriptional controls. Molec. Gen. Genet. 134, 281-287 (1974).

78) Rapin, A.M., Kalckar, H.M. & Alberico, L.: The Metabolic Basis for Masking of Receptor-Sites on E. coli K-12 for C21, a Lipopolysaccharide Core-Specific Phage. Arch. of Biochem. and Biophys. 128, 95-105 (1968).

79) Rattner, D.: The Interaction of Bacterial and Phage Proteins with Immobilized Escherichia coli RNA-Polymerase. J. Molec. Biol. 88, 373-383 (1974).

80) Reiner, A.M.: Escherichia coli females defective in conjugation and in adsorption of a single-stranded deoxyribonucleic acid phage. J. Bact. 119, 183-191 (1974).

81) Riva, S., Fietta, A., Silvestri, L. & Romero, E.: Effect of Rifampicin on Expression of some Episomal Genes of E. coli. Nature 235, 78-80 (1972).

82) Romero, E., Riva, S., Berti, M., Fietta, A. & Silvestri, L.: Pleiotropic Effects of a Rifampicin resistant Mutation in E. coli. Nature 246, 225-228 (1973).

83) Sabourin, D., Beckwith, J.: Deletion of the Escherichia coli crp Gene. J. Bact. 122, 338-340 (1975).

84) Schade, S.Z. & Adler, J.: Purification and Chemistry of Bacteriophage λ . J. Of Virology 1, 591-598 (1967).

85) Schade, S.Z., Adler, J. & Ris, H.: How Bacteriophage χ Attacks Motile Bacteria. J. of Virology 1, 599-609 (1967).

86) Schnegg, B. & Kaudewith, F.: Chromosomal and Episomal Control of Male Specific Properties of E. coli cells. Molec. Gen. Genetics 101, 166-170 (1968).

87) Skurray, R., Hancock, R. & Reeves, P.: Con$^-$ Mutants: Class of Mutants in Escherichia coli K-12 Lacking a Major Cell Wall Protein and Defective in Conjugation and Adsorption of a Bacteriophage. J. Bact. 119, 726-735 (1974).

88) Skurray, R., Guyer, M., Timmis, K., Cabello, F., Cohen, S.N., Davidson, N. & Clark, A.: Replication Region Fragments Clones form Flac are identical to EcoR1 Fragment f5 of F. J. Bact. 127, 1571-1575 (1976).

89) Skurray, R., Nagaishi, H. & Clark, A.: Molecular cloning of DNA from F sex factor of Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 64-68 (1976).

90) Timmis, K., Cabello, F. & Cohen, S.N.: Cloning, Isolation and Characterization of Replication Regions of Complex Genoms. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 2242-2246 (1975).

91) Wada, C., Hiraga, S. & Yura, T.: A Mutant of Escherichia coli Incapable of Supporting Vegetative Replication of F-like Plasmids. J. Mol. Biol. 108, 25-41 (1976).

92) Watanabe, T.: Infectious Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria. Bacteriol. Reviews 27, 87 (1963).

93) Watson, G. & Paigen, K.: Isolation and Characterization of an Escherichia coli Bacteriophage Requiring Cell Wall Galactose. Journal of Virology 8, 669-674 (1971).

94) Willetts, N.S.: Characterization of the F Transfer Cistron traL Gent. Res. Cambridge 21, 205-213 (1973).

95) Willetts, N.: Mapping loci for surface exclusion and incompatibility on the F factor of E. Coli K-12. J. Bacteriology 118, 778-782 (1974).

96) Willetts, N.: The Transcriptional Control of Fertility of F-like Plasmids. J. Mol. Biol. 112, 141-148 (1977).

97) Willetts, N. & Achtman, M.: Genetic Analysis of Transfer by the Escherichia coli Sex Factor F, Using P1 Transductional Complementation. J. Bact. 110, 843-851 (1972).

98) Willetts, N. & Finnegan, D.: Characteristics of Escherichia coli K-12 strains carrying both an F prime and an R factor. Genet. Res. 24, 81-89 (1970).

99) Williams, L. & Meynell, G.G.: Female Specific Phages and F-minus Strains of E. coli K-12. Molec. Gen. Genetics 113, 222-227 (1971).

100) Wollman, E.L., Jacob, F. & Hayes, W.: Conjugation and Genetic Recombination in Escherichia coli K-12. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 21, 141-162 (1956).

101) Yamagata, H. & Uchida, H.: Chromosomal Mutations Affecting the Stability of Sex-Factors. J. Mol. Biol. 63, 281-294 (1972).

102) Yamagata, H. & Uchida, H.: Spectomycin Mutations Affecting the Stability of Sex-Factors in E. coli. J. Mol. Biol. 67, 533-535 (1972).

103) Yanofsky, C. & Lennox, E.S.: Transduction and Recombination Study of Linkage Relationships among the Genes Controlling Tryptophane Syntheses in E. Coli. Virology 8, 425-447 (1959).

Lebenslauf

20. September 1951	geboren in Berlin als Sohn des Kaufmanns Manfred Beutin und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Henkel
April 1958	Einschulung in die Halensee-Schule in Berlin-Wilmersdorf
April 1964	Umschulung auf die Walther-Rathenau-Oberschule in Berlin-Wilmersdorf
Januar 1971	Abitur an der Walther-Rathenau-Oberschule
Juni 1971	Immatrikulation an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Biologie (23)
Juli 1973	Vorprüfung zur Diplomprüfung im Fach Biologie
Februar 1976	Diplomprüfung im Fach Biologie. Die Diplomarbeit mit dem Titel "Genetische Untersuchungen an chromosomalen Mutanten von Escherichia Coli K-12, die Sex Faktor Funktionen beeinflussen" wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin in der Abteilung Trautner unter Anleitung von Dr. M. Achtman angefertigt.
Oktober 1975	Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik unter der Anleitung von Dr. M. Achtman.